

Universitat de Lleida

Seleccion in vitro para resistencia a boro y deoxinivalenol en cebada: marcadores asociados

Natalia García Mariño

<http://hdl.handle.net/10803/385368>



Seleccion in vitro para resistencia a boro y deoxinivalenol en cebada: marcadores asociados està subjecte a una llicència de [Reconeixement-NoComercial-CompartirIgual 3.0 No adaptada de Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/)

(c) 2016, Natalia García Mariño





Universitat de Lleida



Estación Experimental de Aula Dei

“SELECCIÓN *IN VITRO* PARA RESISTENCIA A BORO Y DEOXINIVALENOL EN CEBADA. MARCADORES ASOCIADOS.”

Tesis Doctoral

Programa de doctorado: “Sistemes agrícoles, forestals i alimentaris”.

Presenta:
Natalia García Mariño

Director: Dr. Luis Cistué Solá

Tutor: Dr. Ignacio Romagosa Clariana

Zaragoza, Septiembre 2015

D. LUIS CISTUÉ SOLÁ, Investigador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas

CERTIFICA

Que la Tesis Doctoral titulada “Selección *in vitro* para resistencia a boro y deoxinivalenol en cebada. Marcadores asociados” ha sido realizada por la Bióloga Dña. NATALIA GARCÍA MARIÑO, en el Departamento de Genética y Producción Vegetal, de la Estación Experimental de Aula Dei del Consejo Superior de Investigaciones Científicas bajo su dirección y reúne, a su juicio, las condiciones requeridas para optar al Grado de Doctor en Ciencias.

Zaragoza, Septiembre 2015

Fdo: Luis Cistué Solá.

D. IGNACIO ROMAGOSA CLARIANA, Profesor de la Universidad de Lleida

CERTIFICA

Que la Tesis Doctoral titulada “Selección *in vitro* para resistencia a boro y deoxinivalenol en cebada. Marcadores asociados” ha sido realizada por la Bióloga Dña. NATALIA GARCÍA MARIÑO, en el Departamento de Genética y Producción Vegetal, de la Estación Experimental de Aula Dei del Consejo Superior de Investigaciones Científicas bajo su dirección y reúne, a su juicio, las condiciones requeridas para optar al Grado de Doctor en Ciencias.

Lleida, Septiembre 2015

Fdo: Ignacio Romagosa Clariana

Este trabajo ha sido realizado con cargo a los Proyectos del Plan Nacional de Recursos y Tecnologías Agroalimentarias AGL2005-07195-C02-01, AGL2008-05541-C02-01 y AGL2011-30529-C02-01, con la ayuda de una beca de Formación de Personal Investigador concedida por el Ministerio de Educación y Ciencia.

AGRADECIMIENTOS

En estas líneas quiero dar las gracias a todos aquellos que de alguna manera me han ayudado y apoyado en la realización de esta tesis. No solo se trata de mi esfuerzo sino del de un gran equipo, sin cuyo trabajo no podría haber puesto el punto y final.

En primer lugar agradezco a Luis Cistué, mi director de tesis, la oportunidad de entrar en su grupo para realizar el doctorado, así como su disponibilidad y ayuda.

Al profesor Ignacio Romagosa por aceptar la tutoría de esta tesis y toda la ayuda.

Al profesor Patrick M. Hayes por brindarme la oportunidad realizar las estancias en grupo, su orientación, positividad y afabilidad. A Tanya Filichkin y a Alfonso Cuesta, por toda la ayuda, enseñanzas y consejos. A Ann Corey, Yada Chutimanitsakun, Fernando Martínez, Natalie Graham, Scott Fisk, por el buen ambiente de trabajo y simpatía. A Ana María y Cristina, que me habéis comprendido y animado. A todo el ALA's.

Al personal del departamento de Genética y Producción Vegetal. A Begoña Echevarri, Angel Álvarez y Ana Castillo por toda la ayuda para comenzar diversos ensayos y a Patricia Fustero y Raúl Álvarez por ayudarme con ellos. Por supuesto a María Muñoz, Merche Soriano, Isabel Lacasa, Cristina Silvar, Cristina Casao y Rosa A. Sánchez por su compañerismo y apoyo. A Mapi Valles, María Jesús Espiau por su simpatía.

A José Carlos Martínez por al apoyo con la búsqueda bibliográfica.

A todos los compañeros de Aula Dei, de sección Tupper y Comedor: Pilar Bustos, por el cariño y apoyo, un besazo, Juan y Nuria, Hamdi, Giuseppe, Saúl y Bea por vuestra asistencia y simpatía, Laura, Miren, Ruth, Leticia, Manuel, Jorge, Sara, Vanesa, Rubén, y más que me olvido seguro...muchas gracias a todos por los buenos momentos. Y a toda la gente de Aula Dei, que siempre me han puesto una sonrisa.

A Angel Matilla, Perfecto Paseiro y Fran de la Torre, por el inicio en la carrera científica.

A Ainhoa y David, por el tiempo que compartimos; y a todos mis amigos, que siempre han estado ahí.

A mi familia, indiscutiblemente.

Esta tesis se realizó gracias al programa de Formación de Personal Investigador (FPI) y a la financiación de los proyectos del Plan Nacional de I +D+i AGL2005-07195-C02-01, AGL2008-05541-C02-01 y AGL2011-30529-C02-01

Ós Meus Pais

RESUMEN

La selección *in vitro* es una herramienta utilizada tanto en los programas de mejora para disminuir el tiempo empleado en la obtención de una variedad comercial, así como en investigación para la selección de nuevas combinaciones génicas que implementen una característica fenotípica deseada. Los cultivos de cebada sufren diferentes estreses, bióticos y abióticos, que causan grandes pérdidas en el rendimiento de las cosechas. Entre ellos están la toxicidad del exceso de boro en suelo y la fusariosis de la espiga, una infección causada por hongos del género *Fusarium*.

En este trabajo se desarrollaron dos métodos de selección *in vitro*. Uno para cribar individuos resistentes a estrés por boro y el otro para estrés por *Fusarium*. Se utilizó como material vegetal embriones cigóticos procedentes de plantas doble haploides. En el caso de la toxicidad al boro se aplicó directamente este elemento en el medio de selección. En el caso de la fusariosis y debido a que la resistencia a esta enfermedad presenta varios componentes, se estudió en concreto la resistencia a la acumulación de deoxinivalenol (DON). El DON es una de las toxinas producidas por *Fusarium*, es un factor de virulencia y fue la sustancia utilizada en el medio de selección para la realización del cribado.

Para la producción de las dos poblaciones de doble haploides se partió de sendas poblaciones F1 de un cruzamiento biparental de un cultivar o línea resistente y uno sensible: Sahara 3771 y Clipper para boro; Chevron y PI383933 para DON. Se empleó el método de androgénesis, mediante el cultivo de microsporas o anteras.

La validación de cada método de selección *in vitro* se realizó mediante la comparación de los resultados obtenidos *in vitro* con los resultados de la evaluación del mismo material en ensayos controlados en invernadero, específicos para cada estrés. En el caso del boro se aplicó un exceso de ácido bórico en el agua de riego observándose la sintomatología foliar. En el caso de *Fusarium* se aplicó DON en flores en preantesis, evaluándose la coloración de la pálea y lemma, y la esterilidad.

Paralelamente se verificaron las correlaciones cultivo *in vitro*- invernadero mediante la determinación de nuevos QTL's y comparación de marcadores moleculares y QTL's conocidos para dichos caracteres. En concreto, se utilizaron tres marcadores moleculares de tipo microsatélite de conocida influencia en la resistencia a boro: Bmac93 (localizado en el cromosoma 2H), Bmac67 (3H) y EBmac679 (4H). Se encontraron correlaciones significativas de los dos últimos marcadores con la resistencia observada en la selección *in vitro*, y del Bmac93 con los resultados de invernadero. Para el *Fusarium* se realizó un análisis de DArT de la población y se creó un mapa con dichos marcadores, obteniéndose un total de 12 grupos de ligamiento. Posteriormente se buscaron QTL que se compararon con QTL's conocidos. Se detectaron 57 QTL's relacionados con el cultivo *in vitro*, el ensayo de invernadero y características morfológicas, encontrándose varias coincidencias.

RESUM

La selecció *in vitro* és una eina utilitzada tant en els programes de millora per disminuir el temps emprat en l'obtenció d'una varietat comercial, així com en investigació per a la selecció de noves combinacions gèniques que implementin una característica fenotípica desitjada. Els cultius d'ordi pateixen diferents estressos biòtics i abiòtics, que causen grans pèrdues en el rendiment de les collites. Entre ells estan la toxicitat de l'excés de bor en sòl i la fusariosi de l'espiga, una infecció causada per fongs del gènere *Fusarium*.

En aquest treball es van desenvolupar dos mètodes de selecció *in vitro*. Un per garbellar individus resistents a estrès per bor i l'altre per estrès per *Fusarium*. Es va utilitzar com a material vegetal embrions cigòtics procedents de plantes doble haploides. En el cas de la toxicitat al bor es va aplicar directament aquest element en el medi de selecció. En el cas de la fusariosi i pel fet que la resistència a aquesta malaltia presenta diversos components, es va estudiar en concret la resistència a l'acumulació de deoxinivalenol (DON). El DON és una de les toxines produïdes per *Fusarium*, és un factor de virulència i va ser la substància utilitzada en el medi de selecció per a la realització del cribratge.

Per a la producció de les dues poblacions de doble haploides es va partir de sengles poblacions F1 d'un encreuament biparental d'un cultivar o línia resistent i un sensible: Sahara3771 i Clipper per bor; Chevron i PI383933 per DON. Es va emprar el mètode de androgènesi, mitjançant el cultiu de microsporas o anterres.

La validació de cada mètode de selecció *in vitro* es va realitzar mitjançant la comparació dels resultats obtinguts *in vitro* amb els resultats de l'avaluació del mateix material en assaigs controlats en hivernacle, específics per a cada estrès. En el cas del bor es va aplicar un excés d'àcid bòric en l'aigua de reg observant la simptomatologia foliar. En el cas de *Fusarium* es va aplicar DON en flors en preantesis, avaluant la coloració de la pàlea i lemma, i l'esterilitat.

Paralelamente es van verificar les correlacions cultiu *in vitro*- hivernacle mitjançant la determinació de nous QTL's i comparació de marcadors moleculars i QTL's coneguts per aquests caràcters. En concret, es van utilitzar tres marcadors moleculars de tipus microsatèl·lit de coneguda influència en la resistència a bor: Bmac93 (localitzat en el cromosoma 2H), Bmac67 (3H) i EBmac679 (4H). Es van trobar correlacions significatives dels dos últims marcadors amb la resistència observada en la selecció *in vitro*, i del Bmac93 amb els resultats d'hivernacle. Per al *Fusarium* es va realitzar una anàlisi de DART de la població i es va crear un mapa amb aquests marcadors, obtenint-se un total de 12 grups de lligament. Posteriorment es van buscar QTL que es van comparar amb QTL's coneguts. Es van detectar 57 QTL's relacionats amb el cultiu *in vitro*, l'assaig d'hivernacle i característiques morfològiques, trobant diverses coincidències.

ABSTRACT

In vitro selection is one technique used in breeding programs to reduce the time to get a commercial variety and in investigation to obtain new genic combinations that improve a desired phenotype.

There are many stress, biotic and abiotic, that affect the yield of barley. Among them, we find the excess of soil boron toxicity and *Fusarium* Head Blight (FHB), a fungus infection caused by genus *Fusarium*.

We developed two methods of *in vitro* selection in this work. One method was for the screening of plants resistant to boron stress and the other for plants resistant to scab. The plant material used were zygotic embryos recovered from double haploid plants. For boron toxicity, boron was applied directly into the selection media. For FHB, as it is a very complex disease, we studied the component of resistance for deoxinivalenol (DON) accumulation. DON is one of the toxins produced by *Fusarium*, as well as a virulence factor, and was the substance used in the selection media for carrying out the screening.

The two double haploid populations were produced by androgenesis, via microspores or anther culture. They were produced from two F1 populations derived from a biparental cross between resistant and susceptible cultivars: Sahara 3771 and Clipper for boron, and Chevron and PI383933 for DON.

The validation of the *in vitro* selection method was tested by comparison of the results with those obtained in greenhouse assays. For boron, greenhouse assays consisted in watering the plants with boron excess and taking data of foliar symptoms. For *Fusarium*, DON was applied in pre-anthesis flowers and then was evaluated the sterility and the palea and lemma colors,

At the same time, correlations between *in vitro* selection and greenhouse data were verified by comparison with known QTL's and molecular markers that account for resistance for each stress. Three SSR markers: Bmac93 (localized on chromosome 2H), Bmac67 (3H) y EBmac679 (4H) were used to evaluate correlation for boron resistance. Bmac93 had correlation with results from greenhouse assay, and the other two with *in vitro* selection. For *Fusarium*, the population was analyzed with DArT's. A map was created with the polymorphic markers and we obtained 12 linkage groups. After that, QTL's were searching and were compared with known QTL's for *Fusarium* resistance. We detected 57 QTL's related to *in vitro* culture, the greenhouse assay and morphologic characters.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	xxiii
ÍNDICE DE TABLAS	xxv
ABREVIATURAS	xxvii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 LA CEBADA	3
1.1.1 Origen y situación actual	3
1.1.2 Taxonomía y citogenética	4
1.2 CULTIVO <i>IN VITRO</i>	5
1.2.1 Historia	5
1.2.2 Las plantas haploides	6
1.2.3 Androgénesis	7
1.2.4 Selección <i>in vitro</i>	10
1.3 ESTRÉS ABIÓTICO: LA TOXICIDAD POR BORO	11
1.3.1 Química del boro	11
1.3.2 Zonas geográficas afectadas	12
1.3.3 Origen y soluciones para la toxicidad por boro	12
1.3.4 El boro en las plantas. Funciones	13
1.3.5 Absorción del boro	15
1.3.6 Efectos fisiológicos y toxicidad	16
1.3.7 Genética de la tolerancia a la toxicidad por boro	20
1.3.8 Métodos de determinación de toxicidad en plantas y selección <i>in vitro</i>	22
1.4 ESTRÉS BIÓTICO: LA FUSARIOSIS DE LA ESPIGA	24
1.4.1 Generalidades y taxonomía de <i>Fusarium</i>	24
1.4.2 Desarrollo, evolución de la enfermedad y síntomas	26
1.4.3 Micotoxinas	31
1.4.4 Control FHB	33
1.4.5 Resistencia y mejora	37
1.4.6 Mejora y QTL's	42
1.4.7 Selección <i>in vitro</i> para estrés biótico	44
2. OBJETIVOS	47
3. MATERIAL Y MÉTODOS	51
3.1. MATERIAL VEGETAL GENERAL	53
3.2. CONDICIONES GENERALES DE CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS	53
3.3. PRODUCCIÓN DE DOBLEHAPLOIDES	53
3.3.1. Material vegetal	53
3.3.2. Medios de cultivo	54
3.3.3. Cultivo de anteras	58
3.3.4. Cultivo de microsporas	61
3.3.5. Variables medidas para el cultivo de anteras y microsporas	62
3.4. CULTIVO DE EMBRIONES CIGÓTICOS INMADUROS	63
3.4.1. Condiciones de las plantas donantes y cosecha de las espigas:	63
3.4.2. Esterilización de granos inmaduros:	63
3.5. SELECCIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA POBLACIÓN DH SAHARA x CLIPPER	63
3.5.1. Material vegetal:	63

3.5.2.	Determinación de la concentración de cribado.....	63
3.5.3.	Caracteres estudiados.....	64
3.5.4.	Determinación <i>in vitro</i> de la tolerancia a Boro de las líneas DH de Sahara x Clipper	64
3.6.	CARACTERIZACIÓN DE LA RESISTENCIA/SUSCEPTIBILIDAD AL EXCESO DE BORO DE LA POBLACIÓN DH SAHARA x CLIPPER.....	64
3.6.1.	Material vegetal y condiciones de crecimiento de las plantas	65
3.6.2.	Protocolo de riego	65
3.6.3.	Medición de síntomas.	65
3.7.	GENOTIPADO DE LA POBLACIÓN DH SAHARA x CLIPPER.....	66
3.7.1.	Material vegetal	66
3.7.2.	Condiciones de siembra y cosecha	66
3.7.3.	Preparación de muestras y extracción de DNA	66
3.7.4.	Marcadores, condiciones de la PCR y electroforesis.....	66
3.8.	SELECCIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA POBLACIÓN DH CHEVRON x PI383933.....	68
3.8.1.	Material vegetal	68
3.8.2.	Determinación de la concentración de cribado.....	68
3.8.3.	Caracteres estudiados:.....	68
3.8.4.	Determinación <i>in vitro</i> de la resistencia a deoxinivalenol de las líneas DH Chevron x PI383933.....	69
3.9.	DETERMINACION DE LA RESISTENCIA TIPO V A FHB DE LA POBLACIÓN DH CHEVRON x PI383933.....	69
3.9.1.	Material vegetal y condiciones de crecimiento de las plantas	69
3.9.2.	Pruebas de determinación de concentración de DON a inocular.....	69
3.9.3.	Inoculación del tratamiento de DON sobre la población DH.....	70
3.10.	GENOTIPADO DE LA POBLACIÓN DH CHEVRON x PI383933	70
3.10.1.	Material vegetal	70
3.10.2.	Condiciones de siembra y cosecha	70
3.10.3.	Preparación de muestras y extracción de DNA	70
3.10.4.	Marcadores SSR, condiciones de la PCR y electroforesis.....	70
3.10.5.	Marcadores DArT's	74
3.10.6.	Construcción del mapa de ligamiento.....	75
3.10.7.	Búsqueda de QTL's	75
3.11.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	76
4.	RESULTADOS	77
4.1.	PRODUCCIÓN DE LA POBLACIÓN DE DH SAHARA x CLIPPER	79
4.2.	PRODUCCIÓN DE LA POBLACIÓN DH CHEVRON x PI383933	80
4.3.	SELECCIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA POBLACIÓN DH SAHARA x CLIPPER	81
4.3.1.	Determinación de la concentración de cribado.....	81
4.3.2.	Selección <i>in vitro</i>	87
4.4.	CARACTERIZACIÓN DE RESISTENCIA/ SUSCEPTIBILIDAD AL EXCESO DE BORO DE LA POBLACIÓN DH SAHARA x CLIPPER	91
4.4.1.	Descripción de los resultados.....	91
4.4.2.	Asociación de los resultados con los marcadores moleculares.....	98
4.5.	GENOTIPADO DE LA POBLACIÓN DH SAHARA x CLIPPER	100
4.6.	COMPARACIÓN ENTRE PARÁMETROS DE LA POBLACIÓN DH SAHARA x CLIPPER.....	103

4.7.	SELECCIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA POBLACIÓN DH CHEVRON x PI383933.....	104
4.7.1.	Determinación de la concentración de cribado.....	104
4.7.2.	Selección <i>in vitro</i>	108
4.8.	DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA TIPO V A FHB DE LA POBLACIÓN DH CHEVRON x PI383933.....	114
4.8.1.	Búsqueda concentración de cribado.....	114
4.8.2.	Inoculación de toxina en flores. Fenotipado.....	115
4.8.3.	Relación entre selección <i>in vitro</i> y fenotipo de la población DH Chevron x PI383933.....	116
4.8.4.	Caracterización morfológica de la población Chevron x PI383933	117
4.9.	GENOTIPADO DE LA POBLACIÓN DH CHEVRON x PI383933	118
4.9.1.	SSR	118
4.9.2.	DArT's	118
4.10.	MAPEO DE LA POBLACIÓN DH CHEVRON x PI383933	118
4.11.	BÚSQUEDA DE QTL'S EN LA POBLACIÓN DH CHEVRON x PI383933.....	123
4.11.1.	QTL'S asociados a los caracteres fenotipado por inoculación con toxina	132
4.11.2.	QTL'S asociados a los caracteres de selección <i>in vitro</i>	132
4.11.3.	QTL'S asociados a los caracteres morfológicos.....	132
5.	DISCUSIÓN	133
5.1.	PRODUCCIÓN DE LA POBLACIÓN DH SAHARA x CLIPPER.....	135
5.2.	PRODUCCIÓN POBLACIÓN DH CHEVRON x PI383933	136
5.3.	SELECCIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA POBLACIÓN DH SAHARA x CLIPPER	137
5.3.1.	Búsqueda de la concentración de cribado.....	137
5.3.2.	Selección <i>in vitro</i> y relación con los marcadores moleculares	138
5.4.	CARACTERIZACIÓN DE LA RESISTENCIA/SUSCEPTIBILIDAD AL EXCESO DE BORO DE LA POBLACIÓN DH SAHARA x CLIPPER.....	141
5.5.	COMENTARIOS FINALES DE LA POBLACIÓN DH SAHARA x CLIPPER	143
5.6.	SELECCIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA POBLACIÓN CHEVRON x PI383933.....	144
5.6.1.	Búsqueda de la concentración de cribado.....	146
5.6.2.	Selección <i>in vitro</i>	147
5.7.	DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA DE TIPO V A FHB DE LA POBLACIÓN CHEVRON x PI383933	148
5.7.1.	Correlación selección <i>in vitro</i> - resistencia de tipo V a FHB	150
5.8.	GENOTIPADO, MAPEADO Y BÚSQUEDA DE QTL'S DE LA POBLACIÓN CHEVRONx PI383933	152
5.8.1.	El 1H	152
5.8.2.	El 2H	152
5.8.3.	El 3H.....	153
5.8.4.	El 4H.....	154
5.8.5.	El 5H.....	154
5.8.6.	El 6H.....	154
5.8.7.	El 7H.....	154
6.	CONCLUSIONES	155
7.	BIBLIOGRAFÍA	159

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Producción de plantas mediante (1) cultivo de microsporas por embriogénesis directa y (2) cultivo de anteras, tanto mediante embriogénesis directa de la microspora como con formación intermedia de callo y organogénesis (adaptado de Reynolds (1997)).....	8
Figura 1.2. Dos modelos de eflujo de boro como base de tolerancia en cebada. En el modelo i, el eflujo de $B(OH)_4^-$ se lleva a cabo mediante un transportador permeable a aniones a través de la diferencia de potencial negativa de la membrana, el bajo pH externo y dirigido por el gradiente de concentración. Se requiere energía para las bombas de protones para evitar la despolarización de la membrana plasmática debida al flujo de aniones y para prevenir la acidificación del citoplasma. En el modelo ii, el eflujo de borato ocurre por intercambio aniónico. Si el anión es HCO_3^- no es necesaria la compensación de cargas y la estabilidad el pH se consigue mediante la disociación en OH^- y CO_2 en el citoplasma. Las líneas punteadas indican movimiento pasivo.	19
Figura 1.3. Algunos de los síntomas y efectos del FHB. A/cebada afectada por FHB y B/detalle. C y D/ granos de cebada sanos y afectados, respectivamente. E/ blanqueamiento de espigas de trigo,F/ micelio rosa de <i>Fusarium</i> en trigo.	29
Figura 3.1. Espigas de trigo de la variedad Ehris en diferentes estadios. (A) espiga con microsporas en estado uninucleado temprano-medio, (B) espiga con microsporas en estado uninucleado medio-tardío y (B) espiga con microsporas en estado uninucleado tardío-binucleado temprano. Adaptado de Soriano Castan (2008).....	59
Figura 3.2 Anteras de cebada en medio de pretratamiento.	59
Figura 3.3 Medio de inducción de la embriogénesis de microsporas de cebada. A) Anteras repleta de embriones. B) Medio con anteras y embriones flotando en el medio líquido.....	59
Figura 3.4 Medio de regeneración de embriones de cebada. (A). Embriones después de dos días de siembra. (B). Plántulas regeneradas de 20 días.	60
Figura 3.5 Medio de enraizamiento de plántulas de cebada	60
Figura 3.6 Plántulas doblehaploides de cebada trasladadas a maceta.....	61
Figura 3.7 Medio de inducción de la embriogénesis de cebada con numerosos embriones y callos generados a partir de las microsporas.....	62
Figura 3.8 Imagen de pantalla del programa “Compu Rye, Leaf & Dymptom Area” (Bakr, 2005) para la medición de daño foliar.	65
Figura 4.1 Placas de regeneración de embriones de Sahara, Clipper e Igri en las diferentes concentraciones de cribado: C, control. 1, 10mm boro. 2, 20mm boro. 3, 30mm boro. 4, 40mm boro.	82
Figura 4.2. Efecto de concentraciones crecientes de boro en: A) el número de regenerantes, B) el número de regenerantes reales, B) longitud del tallo, D) longitud de las raíces.	83
Figura 4.3 Cajas magenta con medio de enraizamiento (A,C) y con 10 mm boro (B,D). A, B: plántulas de clipper regeneradas en las diferentes concentraciones testadas de boro (C, 10 mm, 20 mm y 30 mm). C, D: plántulas de sahara regeneradas en las diferentes concentraciones testadas de boro (C, 10 mm, 20 mm, 30 mm y 40 mm).	86
Figura 4.4 Placas de selección <i>in vitro</i> en medio de regeneración control, y tratamiento con boro 30 mm y 40 mm, en los genotipos a) Sahara, b) Clipper, c) línea DH SxC 492, d) línea DH SxC 502.	87
Figura 4.5 Distribución de frecuencias de las variables medidas en la selección <i>in vitro</i> con boro. A) número de regenerantes, B) número de regenerantes reales, B) longitud total de las plántulas, D) longitud del tallo, E) longitud radicular. Las flechas encuadradas indican el grupo al que pertenecen los parentales, C = Clipper, S= Sahara.	88
Figura 4.6 Valores medios de las variables según tratamiento y haplotipo: (A) número de rengenerantes, (B) número de rengenerantes reales, (C) longitud total, (D) longitud de tallo, (E) longitud de raíz.	91
Figura 4.7 Síntomas de toxicidad de boro en la primera hoja de los cultivares sahara, clipper y albacete y en las líneas DH SxC 366 y 473, después de 15 días de riego con agua normal (hojas de la izquierda) o solución de ácido bórico (hojas de la derecha). La barra equivale a un centímetro.	92

Figura 4.8 Distribución de frecuencias del carácter porcentaje de área foliar dañada (%) medida en la población Clipper x Sahara3771 bajo el tratamiento riego con solución de boro. Indico con flecha el grupo al que pertenecen los parentales: S =Sahara, C=Clipper	94
Figura 4.9 Distribución de frecuencias del carácter porcentaje de área foliar dañada (%) según tipo de síntomas, A) tipo i, B) tipo ii, C) tipo iii, D) tipo iv. Medida en la población Sahara3771x Clipper bajo el tratamiento riego con solución de boro. Se indica con una flecha el grupo al que pertenecen los parentales: S =Sahara, C=Clipper.....	97
Figura 4.10 Efectos, expresados como porcentaje de daño foliar, de los alelos sahara bajo el tratamiento de riego con ácido bórico en las diferentes fases de desarrollo de daño foliar.	99
Figura 4.11 Línea DH SxC 492 (I) resultados para selección <i>in vitro</i> en diferentes concentraciones de boro (II) síntomas foliares del exceso de boro (a) controles (b) regadas con agua con exceso de boro.....	103
Figura 4.12 Placas de selección para la línea PI383933, y los cultivares Chevron y Legacy. C= control, 1=0,1 mg de DON/l; 2=0,5 mg de DON/l; 3= 1 mg de DON/l; 4= 2,5 mg de DON/l; 5= 5 mg de DON/l; 6= 10 mg de DON/l; 7= 15 mg de DON/l	104
Figura 4.13 efecto de concentraciones crecientes de DON (tratamientos) en a) número de regenerantes, b) número de regenerantes reales, c) longitud total de las plántulas, d) longitud del tallo, e) longitud radicular, f) peso fresco.....	106
Figura 4.14. Cajas magenta con medio de enraizamiento. Contiene plántulas transplantadas a medio de enraizamiento de tres genotipos, pi383933, chevron y legacy, provenientes de placas de regeneración control, 2,5 mg de DON/l; 5 mg de DON/l; 10 mg de DON/l; y 15 mg de DON/l.	107
Figura 4.15. Distribución de frecuencias de la serie I bajo condiciones de estrés para las variables A) número de regenerantes, B) número de regenerantes reales, B) longitud total, D) longitud de tallo, E) longitud de raíz.	108
Figura 4.16 Distribución de frecuencias de la serie II bajo condiciones de estrés para las variables A) número de regenerantes, B) número de regenerantes reales, C) longitud total, D) longitud de tallo, E) longitud de raíz. En flechas aparece el grupo al que pertenecen los parentales, Ch=Chevron y PI=PI383933.	109
Figura 4.17 A) Espiga tratada con toxina. Se observan las dos flores tratadas en esta espiga, la 3 y 4 empezando por la base de la espiga. B) espiga control. Se observan las flores tratadas, correspondientes a las número 2 y 3 empezando por la base de la espiga.	114
Figura 4.18 Búsqueda de concentración de cribado con los genotipos parentales.	115
Figura 4.19. Categorías de color utilizadas para comparar las líneas bajo el tratamiento con 1,25 mg DON/l. En la columna izquierda aparece de izquierda a derecha una flor control en su vista delantera, trasera e interior. En la columna de la derecha aparece una flor tratada del mismo genotipo en su vista delantera, trasera e interior.....	115
Figura 4.20 Distribución de frecuencias de las variables color y porcentaje de esterilidad de las líneas Chevron x PI383933 bajo el tratamiento con toxina. En flechas aparece el grupo al que pertenecen los parentales, Ch=Chevron y PI=PI383933.....	116
Figura 4.21. Distribución de frecuencias para los caracteres morfológicos: A) altura de la planta, B) número de cañas, C) número de granos por espiga, D) longitud de la espiga, E) número de flores por espiga. Ch= chevron, PI=PI333839.....	117
Figura 4.22. Representación de los 12 grupos de ligamiento obtenidos y correspondencia con los cromosomas de cebada.....	121
Figura 4.23 Disposición de los QTL detectados en los diferentes grupos de ligamiento. Con cuadrícula rayada los qtl relacionados con la selección <i>in vitro</i> , con cuadrícula a rombos los QTL relacionados con la morfología de las plantas, y en cuadrícula negra los relacionados con los caracteres de fenotipado de inoculación de DON en la flor.	129

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Tolerancia relativa de diferentes cultivos y ornamentales a boro (la tolerancia disminuye a medida que se desciende en la columna). La tolerancia está basada en la concentración de boro en agua de riego en la que se observaron los síntomas de toxicidad por boro, creciendo las plantas en arena. No necesariamente indica reducción en el rendimiento.	16
Tabla 1.2 Descripción de síntomas foliares en varios cultivos.	17
Tabla 1.3 Cromosomas de cebada y trigo DON de se han validado los genes <i>BoT1</i> , <i>BotTy</i> <i>BoT3</i>	22
Tabla 1.4 Especies de patógenos causantes de fusariosis en cereales en España. Datos recopilados de (MAPA 2010)	25
Tabla 1.5. Taxonomía de <i>Fusarium</i>	26
Tabla 1.6 Toxinas de <i>Fusarium</i> , cultivos en que aparece y efectos en la salud animal y humana. (Wu, 2007)	30
Tabla 1.7 Límites establecidos para DON y zearelon en ppb en productos de consumo de humano basados en la regulación de la comisión europea (WC) 1881/2006.	30
Tabla 1.8 Especies toxigénicas de <i>Fusarium</i> asociadas a cereales y sus micotoxinas. Extraído de (Logrieco et al., 2003)	31
Tabla 1.9 Buenas prácticas agronómicas e impacto.	37
Tabla 1.10 Resumen de los principales QTL's encontrados para resistencia a la FHB.	44
Tabla 3.1 Variedades utilizadas y sus características generales.	53
Tabla 3.2. Composición del medio de pretratamiento.	54
Tabla 3.3. Composición del medio FHG (Hunter)	55
Tabla 3.4. Contenido de Ficoll 400 necesario para los medios "FHG líquido", "FHG-ficoll 200" y "FHG-ficoll 400".	55
Tabla 3.5. Composición del medio FHG (Hunter)	56
Tabla 3.6. Composición del medio de enraizamiento MS+ANA (modificación de Murashige&Skoog, 1962)	57
Tabla 3.7 Resumen de las fases del cultivo de anteras	58
Tabla 3.8 Resumen de las fases del cultivo de microsporas	61
Tabla 3.9 Descripción de los microsatélites utilizados en el genotipado: localización cromosómica, motivo y tamaño en pares de bases, índice de diversidad (DI) y secuencias cebadoras.	66
Tabla 3.10. Marcadores utilizados en el genotipado y QTL que determinan.	67
Tabla 3.11 Nomenclatura de concentraciones usadas en la selección <i>in vitro</i>	68
Tabla 3.12 Marcadores asociados a QTL's de diferentes componentes de resistencia a FHB, y poblaciones DON de se encontraron.	71
Tabla 3.13 Condiciones de amplificación de los diferentes marcadores.	73
Tabla 4.1 Variables de respuesta al cultivo de anteras y microsporas.	79
Tabla 4.2 Número de plantas totales y número de carreras.	80
Tabla 4.3 Variables de respuesta al cultivo de anteras.	81
Tabla 4.4 Medias de cada carácter en cada tratamiento y genotipo: diferencias en la respuesta al tratamiento dentro de cada genotipo.	84
Tabla 4.5 Diferencias de medias entre los genotipos para cada carácter.	84
Tabla 4.6 Efectos determinados en el análisis RELM, del alelo Sahara en cada locus e interacción entre diferentes loci.	89
Tabla 4.7 Efectos del alelo Sahara, determinados en el análisis RELM, en la interacción del tratamiento B3 o B4 con cada locus e interacción con diferentes loci.	90
Tabla 4.8 Porcentaje de superficie dañada para las líneas dh de la población ClipperxSahara3771 y los cultivares Igri, Albacete, Plaisant y Steptoe. Datos recogidos a los 12 días de emergencia y bajo condiciones control y estrés por exceso de boro en el agua de riego.	92
Tabla 4.9 Separación de medias para el carácter porcentaje de daño foliar.	94
Tabla 4.10 Medias de porcentaje de daño foliar para cada loci o interacción.	98

Tabla 4.11 Efectos del alelos Sahara en el carácter porcentaje de daño foliar, para cada interacción.	99
Tabla 4.12 Efectos sobre el tipo de daño de los loci, sus interacciones y las interacciones de los loci con el tratamiento.....	100
Tabla 4.13 Haplotipos en la población DH SxC, los cultivares Sahara y Clipper, y clasificación de cada línea según el número de carreras.	101
Tabla 4.14 Número de líneas dh con los alelos de Clippero o Sahara para cada marcador.	102
Tabla 4.15 Frecuencia de los haplotipos obtenidos en el genotipado con los marcadores Bmac93, Bmac67 y EBmac679.	102
Tabla 4.16 Correlaciones entre todas la variables medidas en el fenotipado y la selección <i>in vitro</i>	103
Tabla 4.17 Separación de medias Duncan realizada para los DH de la población Chevron x PI383933 de la serie I para las variables número de regenerantes (NR) y número de regenerantes reales (NRReal).	110
Tabla 4.18 Separación de medias Duncan realizada para los DH de la población Chevron x PI383933 de la serie I para las variables: longitud total, longitud de raíz y longitud de tallo.	111
Tabla 4.19 Separación de medias Duncan realizada para los dh de la población Chevron x PI383933 de la serie II para las variables número de regenerantes (NR) y número de regenerantes reales (NRReal).	112
Tabla 4.20 Separación de medias duncan realizada para los DH de la población Chevron x PI383933 de la serie II para las variables: longitud total, longitud de raíz y longitud de tallo.	113
Tabla 4.21 Correlaciones entre variables de selección <i>in vitro</i> y fenotipado.....	117
Tabla 4.22 Distribución de marcadores en cada grupo de ligamiento: número de marcadores, distancia que cubren en el mapa y distancia media de separación entre ellos para cada grupo de ligamiento.....	119
Tabla 4.23 QTL's detectados en cada cromosoma, posición, marcador asociado, efecto aditivo, intervalo y R^2	124

ABREVIATURAS

AcDON: Acetil Deoxinivalenol
AFLP: *Amplified Fragment Length Polymorphism*

Altura: Altura de la planta
ANA: Ácido naftalen-acético
ANOVA: Análisis de varianza
ATPasa: Adenina trifosfato sintasa
AUDPC: Área bajo la curva de progreso de la enfermedad

B: Boro
BAP: 6-bencilaminopurina

C: Clipper
Cañas: Número de cañas
CxS: Clipper x Sahara
Ch: Chevron
ChxPI: Chevron x PI383933
CIM: *Composite Interval Mapping*
cM: centiMorgan

dNTP: desoxirribonucleótidos tri fosfato
DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato
DArT: *Diversity Arrays Technology*
DH: Doble haploides
DNA: Acido desoxirribonucleico
DON: Deoxinivalenol
DPA: Días Post-Antesis

EEAD: Estación Experimental de Aula Dei
EEUU: Estados Unidos de America

FAO: *"Food and Agriculture Organization"*
FHB: *Fusarium Head Bligh*,
FHG: Medio de cultio de Hunter
Flores: Número de flores por espiga

Granos: Número de granos por espiga.

h: horas

IAA: ácido indol-acético

KD: *kernel discoloration*

L: Litros
LEsp: Longitud de espiga
LOD: *Logarithm of odds score*
LT: Longitud total de la plántula
LTa: Longitud del tallo de la plántula
LR: Longitud radicular de la plántula

M: molar
MAPA: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentacion
mg: miligramos
ml: mililitros
MIP: *Major Intrinsic Proteins*
ML: Máxima verosimilitud
MS: Medio de cultivo Murashige and Skoog

ng: nanogramos
NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido
NReg: Número de regenerantes
NRReal: Número de gerenerantes reales

OMS: Organización Mundial de la Salud

ppb: partes por billón
pb: pares de bases
PC: Pared celular
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PIC: Polimorphism Information Content

QTL: *Quantitative Trait Loci*

RELM: *Method of residual maximum likelihood*

RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RG-II: Ramnoarabinogalactano II

RNA: Ácido ribonucleico

r.p.m.: revoluciones por minuto

S: Sahara

SxC: Sahara x Clipper

SSR: *Simple Sequence Repeat*

STS: *Sequence Tagged Site*

Taq: *Thermus aquaticus*

TBE: Disolución tampón formada por
Tris, borato y EDTA

TMV: Virus mosaico del tabaco

URSS: Unión de Repúblicas Socialistas
Soviéticas

V: voltios

WANA: *West Asia- North Africa*

µg: microgramos

µL: microlitros

µM: micromolar

°C: grados centígrados

%: porcentaje

1.INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

La población humana no deja de aumentar, por ello se hace imperativo un incremento en el rendimiento de las cosechas. La producción vegetal puede aumentar mediante la protección de los cultivos a los factores adversos o bien produciendo germoplasma adaptado a éstos. La producción de cultivares adaptados a diferentes estreses constituye una parte del interés de la mejora genética vegetal, aunque existen otros enfoques como la mejora de la producción, de la calidad, de la estética y los valores nutricionales. Frankel (1958) definió la mejora vegetal como "la ciencia cuyo objetivo es cambiar el genotipo, mejorándolo para un determinado medio y según el aprovechamiento para el que se vaya a destinar de acuerdo con las necesidades del hombre". Por ello, para la realización de cualquier programa de mejora existen tres premisas fundamentales: la existencia de variabilidad de los caracteres, la capacidad de detección de esta variabilidad y la posibilidad de poder manipularla.

El cultivo *in vitro* es una herramienta que cobra cada día más importancia en la mejora vegetal. Nos permite detectar la variabilidad y manipularla. Es parte esencial de diferentes disciplinas como transformación genética, mutagénesis, multiplicación vegetal, selección *in vitro* y producción de doble haploides, cada una de ellas con objetivos diferentes pero que pueden ser complementarias dentro de un programa de mejora. Por todo esto, en el marco de este trabajo se planteó la validación de un sistema de selección *in vitro* para estreses abióticos y bióticos con plantas doble haploides.

La producción de plantas doble haploides se realiza de manera rutinaria en el laboratorio de "Cultivo Celular y de Tejidos" de la EEAD (Estación Experimental de Aula Dei) para diversas especies vegetales, entre ellas la cebada. La cebada es uno de los cultivos de mayor producción en nuestro país, es de fácil manejo agrícola, presenta la posibilidad de varias generaciones en un año (en invernadero), y tiene un buen comportamiento de cultivo *in vitro*, por lo que parecía clara la elección de esta especie para realizar el proyecto.

El estrés abiótico escogido para el estudio fue la toxicidad de boro ya que se conocen QTL's y genes implicados en su tolerancia en cebada y resulta fácil la reproducción en invernadero de los efectos causado por el exceso de boro. El estrés biótico estudiado fue la resistencia a la toxina deoxinivalenol (DON) producida por hongos del género *Fusarium* en la enfermedad "fusariosis de la espiga". La posibilidad de adquirir comercialmente esta toxina purificada y su utilización en medios de selección *in vitro* representa una ventaja sobre el uso de filtrados. Los cócteles constituyen verdaderos cócteles de sustancias que enmascaran o no permiten discernir el efecto real de la toxina sobre el huésped.

1.1 LA CEBADA

1.1.1 Origen y situación actual

La cebada, junto los trigos Emmer y Einkorn, es uno de los cultivos fundadores de la producción alimentaria del mundo agrícola Neolítico. Los primeros restos arqueológicos de cebada recolectada datan de alrededor de 19.000-17.000 a.C. y fueron encontrados en zonas preagrícolas del Oriente Próximo (Kislev et al., 1992). Para una mayor revisión ver a Zohary and Hopf (2000). Los restos encontrados identifican al ancestro de las cebadas cultivadas actuales como una cebada silvestre de dos carreras, de grano cubierto, raquis frágil y todavía hoy abundante en la naturaleza que conocemos

como *Hordeum vulgare* spp. Spontaneum (C. Koch) Thell, (Harlan and Zohary, 1966; Zohary, 1969). Se considera que la domesticación de la cebada comenzó hace unos 10.000 años en el llamado Creciente Fértil, zona que actualmente se corresponde con Israel, Jordania, Libia Turquía e Iraq, mediante la selección de plantas mutantes para el número de carreras y tenacidad del raquis (Zohary and Hopf, 2000)

Desde el Creciente Fértil el cultivo de cebada y trigo se expandió por la costa norte africana, Grecia e Irán, alcanzando Marruecos, India y Etiopía hacia el 8.000 a.C., lugares propuestos como posteriores centros de origen o diversificación (Molina-Cano et al., 1999; Azhaguvel and Komatsuda, 2007). A España se considera que llegaría alrededor del año 5.000 a.C.

Actualmente los cereales representan la principal fuente de aporte calórico frente a otros constituyentes de la dieta (FAO, 2008). A nivel mundial, los cereales más cultivados son el trigo el arroz y el maíz, ocupando la cebada el cuarto puesto. En España la cebada ocupa la cabeza de la producción cerealista nacional, representando el 45% de los cereales producidos (MAPA, 2010). Esto se debe a que es el cultivo del que se ponen mayor número de hectáreas por su capacidad de adaptación al medio ambiente.

De las 57 millones de Ha de cebada cultivadas en el mundo más de la mitad pertenecen a países en vías de desarrollo donde es un producto básico en la alimentación. La cebada de alimentación se encuentra en regiones con condiciones donde la producción de otros cultivos está limitada, por ejemplo zonas con un régimen pluviométrico pobre, altitud o problemas de salinidad (Grando and Macpherson, 2002). En los países desarrollados el principal destino de la cebada es la alimentación animal, siguiendo en importancia la destinada a maltería para la producción de cerveza y otras bebidas alcohólicas destiladas. Además, en los últimos años el consumo de cebada como alimento saludable ha sido objeto de un interés creciente en los países desarrollados ya que se han encontrado beneficios nutricionales importantes entre los que destacan las sustancias bioactivas. Entre sus virtudes caben destacar su efecto sobre la regulación del índice glicémico y la hipertensión, previene enfermedades coronarias, el estreñimiento, diabetes y ciertos tipos de cáncer (McKevith, 2004).

1.1.2 Taxonomía y citogenética

La cebada pertenece al género *Hordeum* de la tribu *Triticeae* de la familia de *Poaceae*, las gramíneas (Stevens, 2001):

Reino: *Plantae*

Subreino: *Tracheobionta*

Superdivisión: *Spermatophyta*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Liliopsida*

Subclase: *Commelinidae*

Orden: *Cyperales*

Familia: *Poaceae*

Tribu: *Triticeae*

Género: *Hordeum*

El género *Hordeum* está constituido por 32 especies di, tetra y hexaploides ampliamente distribuidas en ambos hemisferios (von Bothmer et al., 1995). Las cebadas cultivadas son todas de la especie *Hordeum vulgare* L., constando ésta de tres

subespecies: *hexastichum*, cebadas hexásticas, las únicas de la especie consideradas no silvestres; *distichum*, dísticas; y *spontaneum* (Molina Cano, 1989).

Desde un punto de vista práctico la cebada se clasifica atendiendo a características como:

- Morfología de la espiga: cebadas de dos y seis carreras.
- Ciclo vegetativo: ciclo largo o de invierno, que necesitan un periodo de vernalización para florecer; y de ciclo corto o de primavera, que no necesitan vernalizar.
- Uso final: forrajeras o malteras.

La cebada, *Hordeum vulgare* L., es una especie diploide y autógena. Tiene una dotación de 5.100 Mb por genoma haploide (Arumuganathan and Earle, 1991), por lo que su tamaño es menor que el de otros miembros de la familia (Bennett and Leitch, 2005). Su material genético se distribuye en siete cromosomas homeólogos a otros miembros de la tribu Triticeae (Linde-Laursen et al., 1997).

La cebada es considerada una especie modelo por: su relativamente pequeños genoma y ciclo vegetativo; alta variabilidad morfológica y fisiológica disponible, disponibilidad de los stocks genéticos en bancos de germoplasma, facilidad de su mantenimiento, y porque existen mapas genéticos bien definidos (Forster, 1997; Consortium, 2012).

Como se comentó al inicio de la introducción, es imprescindible conocer las fuentes de variabilidad de las especies que tratamos de mejorar. En el género *Hordeum* el acervo genético primario consta de especies cultivadas que no impiden la transferencia genética o presentan pocas barreras para ésta. Ejemplos son las variedades locales (landraces) y la subespecie *H.vulgare* spp *spontaneum*. Los problemas que se presentan al usar este fondo genético es la desaparición de variedades locales que se han producido en determinadas zonas, como el caso de norte Europa, y la introgresión de caracteres agronómicos no deseables.

El acervo genético secundario consiste en todas las especies silvestres de cebada de *Hordeum bulbosum*. Tienen una buena aptitud en el cruzamiento aunque se puedan presentar algunos casos de esterilidad.

El acervo genético terciario lo constituyen todas las otras especies de *Hordeum* donde la producción de híbridos interespecíficos se realiza gracias a técnicas de rescate de embriones. Estas especies poseen diferentes genomas al de la cebada cultivada por lo que los híbridos resultan en su mayoría estériles (von Bothmer et al., 1995).

1.2 CULTIVO IN VITRO

1.2.1 Historia

Las primeras referencias al cultivo de tejidos vegetales *in vitro* se remontan a 1902 cuando Haberlandt, con la teoría de la totipotencialidad celular acuñada por Morgan, comenzó a probar cultivos de células de *Tradescantia*. La idea era mantener cultivos celulares de tejidos para poder estudiar las células como elementos individuales (Dodds and Roberts, 1985). No se consiguieron grandes resultados por la falta de condiciones asépticas, porque la formulación de los medios no era la adecuada y por el uso de tejidos demasiado diferenciados. Sin embargo, sí se obtuvieron buenos resultados en el cultivo de embriones inmaduros, publicándose los primeros artículos sobre el tema en la primera década del siglo XX (Hanning, 1904; Brown, 1906).

Hubo que esperar hasta los años 30 para obtener los primeros logros en el mantenimiento continuado de tejidos vegetales y la formación de callos *in vitro*, en parte gracias a la adición de reguladores de crecimiento al medio nutritivo. Estos resultados están reflejados en la publicación del libro “The Cultivation of Animal and Plant Cells” de White (1954) y en los trabajos de Nobecourt (1937) y Gautheret (1937).

Entre las principales aplicaciones de las técnicas de cultivo *in vitro* se encontraban: su uso en estudios bioquímicos, la rotura de la dormancia de las semillas para así poder acortar los ciclos de mejora, y el rescate de embriones que no eran capaces de completar su ciclo en frutos de maduración temprana (en los que la nucela e integumento colapsan) o provenientes de cruces interespecíficos (vencimiento de incompatibilidad intergenéricas o interespecíficas). Actualmente, la utilización de los métodos de cultivo *in vitro* siguen teniendo los mismos fines, si bien también se les han dado nuevos enfoques como son la mutagénesis, la transformación génica, la producción comercial de clones, preservación de germoplasma, producción de metabolitos secundarios, la embriogénesis somática y la producción de haploides.

1.2.2 Las plantas haploides

Las plantas haploides se definen como esporofitos cuya dotación cromosómica es la gamética (Kasha, 2005). Son viables, pero estériles y normalmente de menor tamaño (Kondorosi et al., 2000). Cuando se duplica la dotación cromosómica de un haploide, espontáneamente o mediante inducción química, se obtienen plantas doble haploides (DH) y éstas son fértiles y completamente homocigotas.

Blakeslee (1922) observó que la haploidía ocurría de forma natural en *Datura stramonium*. A partir de él, diversos investigadores advirtieron que también se producía espontáneamente en otras solanáceas (Ramanna and Hermesen, 1974) y otros géneros no relacionados, como *Narcissus*, en los que se ha descrito minuciosamente la formación de polen multinucleado y su posterior desarrollo a embriode, y planta. La haploidía ocurre espontáneamente en la naturaleza por el desarrollo de un embrión a partir de una ovocélula no fecundada (partenogénesis), a partir de otra célula del saco embrionario (apogamia) o a partir del gameto masculino (androgénesis) (Thorpe, 1995). Sin embargo, la ratio a la que se producen haploides en la naturaleza es realmente bajo y no resulta aprovechable en programas de mejora. Para más información sobre producción de plantas haploides mediante embriogénesis consultar Thorpe (1995).

En los programas de investigación antes de los años 60 la producción de plantas haploides se conseguía mediante cruces interespecíficos en los que uno de los complementos cromosómicos era eliminado, o mediante la irradiación de polen. Hubo que esperar hasta 1964 momento en que Guha y Maheshwari demostraron la totipotencia *in vitro* de los gametófitos masculinos en *Datura*, o lo que es lo mismo, la androgénesis o embriogénesis de la microspora, para comenzar con una producción eficiente de DH de un gran número de especies.

Las líneas DH son especialmente útiles en estudios genéticos y actualmente se utilizan rutinariamente en la elaboración de mapas genéticos, identificación de QTL's, mutagénesis *in vitro* o transformación (Szarejko 2003, Devaux and Pickering 2005, Forster and Thomas 2005). Desde el punto de vista de mejora vegetal las plantas DH se pueden producir en las últimas fases del programa de mejora para la fijación de los caracteres de una variedad. Sin embargo, es habitual su producción en fases más tempranas ya que las líneas DH pueden ser seleccionadas directamente por su fenotipo, reduciendo prácticamente a la mitad el tiempo empleado en los programas de mejora.

Así, para la cebada es posible el registro de una variedad y su salida al mercado de una nueva variedad en seis o siete años.

Un método de producción de DH debe cumplir una serie de requisitos para ser útil en un programa de mejora: debe ser eficiente en la producción de plantas haploides y en la duplicación cromosómica, siendo éstas genéticamente estables y presentar buen comportamiento agronómico; tiene que haber disponibilidad de un gran número de genotipos con buena respuesta al cultivo *in vitro*; y por último la población de DH debe representar una muestra aleatoria de los gametos parentales (Jain et al., 1996)

Los métodos de obtención de plantas haploides son:

- Gimnogénesis:

Bajo condiciones específicas *in vitro* se produce la formación de un embrión a partir de una célula del saco embrionario. No ocurre albinismo.

- Hibridaciones interespecíficas e intergenéricas:

Producción de un embrión haploide mediante la eliminación del genoma del parental masculino. Se suele usar en monocotiledóneas ya que no presenta el problema de albinismo y tienen una alta estabilidad genética. Suele fallar el desarrollo del endospermo por lo que los embriones deben ser rescatados y hay que aplicar tratamientos diploidizantes.

- Partenogénesis:

Cuando se produce el desarrollo de un embrión a partir de la ovocélula no fecundada o de cualquiera otra célula del saco embrionario. Se puede inducir artificialmente mediante polen inactivado o mediante tratamientos químicos.

- Mediante el gen iniciador de haploidía, en cebada el gen *hap* (Hagberg and Hagberg, 1980).

- Androgénesis:

Donde las microsporas sufren embriogénesis directa y producción de plántula u organogénesis, pudiendo pasar por una fase intermedia de callo que puede dar lugar a mutaciones.

1.2.3 Androgénesis

La androgénesis es el proceso que lleva a la generación de una planta (haploide) cuya dotación genética es idéntica a la del núcleo del gameto masculino del que procede. Este gameto masculino es la microspora, la célula que normalmente dan lugar a un grano de polen mediante dos divisiones mitóticas sucesivas.

La androgénesis se fundamenta pues en la posibilidad de cambiar *in vitro* el patrón normal de la microspora de desarrollo a polen (desarrollo gametofítico), hacia la formación de un embrión o estructura organizada capaz de regenerar una planta completa (desarrollo esporofítico). Como exponen Rashid et al. (1982) “se puede concluir que los granos de polen embriogénicos son estructuras durmientes que permanecen inactivas *in vivo* pero pueden ser activadas para formar embriones o tejidos *in vitro*”. En el proceso de androgénesis se producen una serie de cambios subcelulares como la aparición de una capa fibrosa alrededor del citoplasma, aumento de la síntesis citoplasmática y de la división celular, rediferenciación de organelas y la aparición de granos de almidón y lípidos, fácilmente reconocibles bajo microscopio. También se produce la rediferenciación de mitocondrias y cloroplastos, llevando al problema del albinismo en cereales.

La producción de plantas haploides por androgénesis comprende dos métodos: el cultivo de anteras y el cultivo de microsporas aisladas (Figura 1.1).

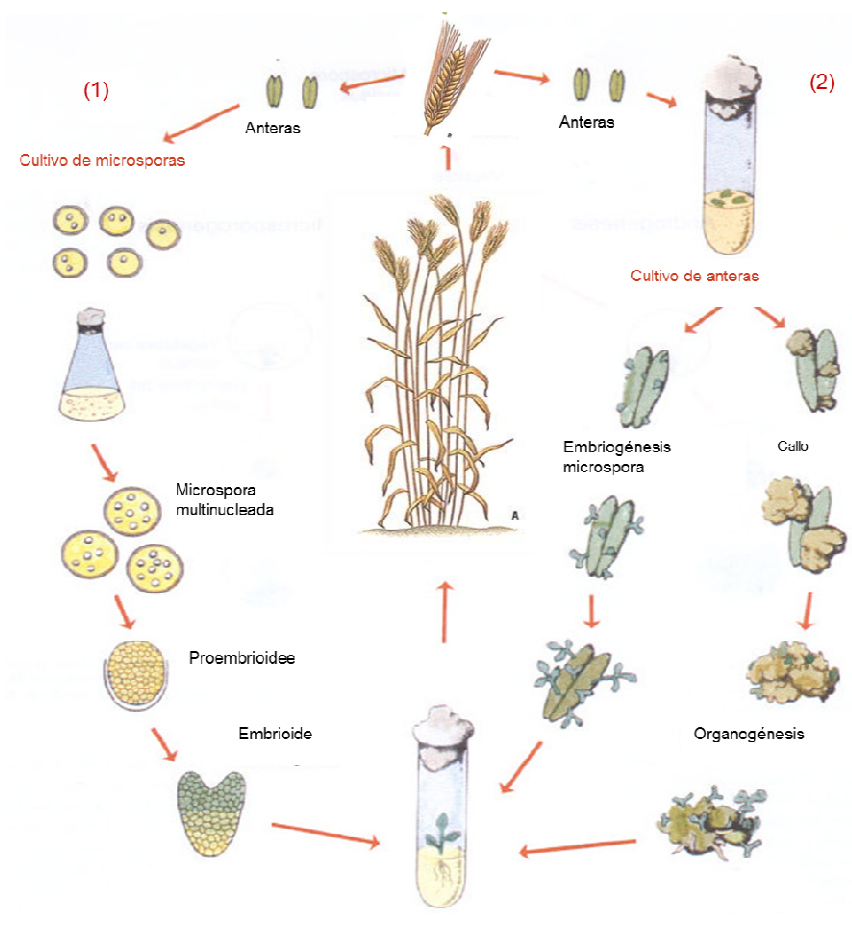


Figura 1.1 Producción de plantas mediante (1) cultivo de microsporas por embriogénesis directa y (2) cultivo de anteras, tanto mediante embriogénesis directa de la microspora como con formación intermedia de callo y organogénesis (Adaptado de Reynolds (1997))

En cuanto a la elección del método de androgénesis, éste dependerá de la intención final del estudio, si bien el cultivo de microsporas presenta algunas ventajas frente al cultivo de anteras, como:

- a) la eliminación de tejidos esporofíticos de la antera, que permite condiciones más controladas de cultivo en cuanto a nutrientes disponibles,
- b) desechar la posibilidad de que estos tejidos sufran embriogénesis somática,
- c) ofrece la posibilidad de purificar las microsporas viables, eliminando sustancias perjudiciales generadas por las no viables, y
- d) permite la observación directa durante el proceso de embriogénesis.

A la hora de realizar un estudio con cultivo de anteras o microsporas hay que tener en cuenta una serie de factores que afectan a la producción de plantas:

- Genotipo:

El efecto genético es uno de los más importantes. En cebada se considera que el genotipo es responsable del 60% de variabilidad observada para frecuencia de embriogénesis (Larsen, 1991), y además también en la frecuencia de regeneración y de producción de plantas verdes (Larsen, 1991; Cistué et al., 1999). Al no observarse diferencias para estos caracteres en cruzamientos recíprocos se concluyó que la capacidad embriogénica se transmite mediante genes nucleares (Tuveesson et al., 1989; Bruins and Snijders, 1995).

- Condiciones de crecimiento de las plantas donantes:

El crecimiento de las plantas debe tener unas condiciones óptimas de intensidad lumínica, fotoperiodo, temperatura, humedad y nutrientes (sobre todo de aporte nitrogenado), siempre en relación a la especie con la que trabajamos. De otro modo tendrán problemas de crecimiento que afectarán a la capacidad de respuesta de las microsporas y a la inducción de embriogénesis (Ouyang et al., 1987). También la edad de la planta donante influye en la embriogénesis así como otros tratamientos externos que se puedan emplear rutinariamente. Por ejemplo, aplicar tratamientos plaguicidas puede tener efectos adversos sobre la respuesta androgénica (Cistué L. et al., 2004).

- Estadío de desarrollo del polen:

El estadio más apropiado de desarrollo de la microspora para iniciar a un proceso androgénico depende de la especie y del método de androgénesis que vayamos a utilizar. Normalmente el estadio varía entre uninucleado temprano y binucleado temprano. En el caso de los cereales, es el uninucleado medio, para el cultivo de anteras, o tardío, para el de microsporas (Hoekstra et al., 1992). La identificación del estadio se puede realizar estableciendo una correlación entre los estados de desarrollo de las microsporas y distintos caracteres morfológicos de la espiga (Cistué L. et al., 2004).

- Pretratamiento utilizado:

Para que la microspora abandone el camino gametofítico y siga una vía esporofítica, normalmente hay que aplicar un pretratamiento. El pretratamiento a utilizar depende de la especie y del tejido vegetal. Los más utilizados son: choques térmicos, tratamientos con colchicina, químicos y reguladores del crecimiento, tratamiento con rayos gamma, reducción de la presión atmosférica, modificación de pH, pretratamiento de frío e inanición de carbohidratos. En cebada se suelen utilizar los dos últimos. Para la inanición de carbohidratos se sustituye la fuente de carbono por azúcares no metabolizables, como el manitol, para estabilizar la osmolaridad del medio. Altas concentraciones de estos azúcares ejercen, además, un estrés osmótico adicional al propio ayuno de carbohidratos (Ouyang et al., 1987; Cistué et al., 1994). Cuando se trabaja con genotipos recalcitrantes, la concentración de manitol se incrementa hasta 1,0-1,5 M (Cistué et al., 1999). El tratamiento por frío se suele realizar a 4°C para cebada y trigo, a 8°C para otros cereales, durante 28 días.

- Composición del medio de cultivo:

El medio de cultivo más utilizado en gramíneas es el MS (Murashige and Skoog, 1962) con distintas modificaciones. En nuestro laboratorio se usa de manera rutinaria en cebada el medio FHG (Hunter, 1988), un medio MS (Murashige and Skoog, 1962) en el que se ha modificado la fente de carbono sustituyendo la sacarosa por maltosa. Esto contribuye a aumentar la calidad de los embriones y a producir un mayor número de plantas verdes (Castillo et al., 2000).

Una fuente de nitrógeno también resulta indispensable. Normalmente se usa como tal la glutamina, asparragina, metionina, o la prolina. El FHG contiene una elevada concentración de nitrógeno orgánico mediante la adición de glutamina y la disminución de la concentración de NH_4NO_3 (Olsen, 1987).

Los reguladores de crecimiento que han dado buenos resultados en cebada son las auxinas IAA (ácido indol-acético) y ANA (ácido naftalen-acético). La presencia de

auxinas es un factor crítico en cereales para una buena respuesta embriogénica (Ziauddin and Kasha, 1990).

Las citoquinas son indispensables para el crecimiento y control de la diferenciación celular. Se utiliza habitualmente 6-bencilaminopurina (BAP) (Cistué et al., 1995) o bien kinetina.

El agente gelificante más usado y barato es el agar. Sin embargo, para el cultivo de anteras de cereales, un medio sólido presenta peores resultados que un medio líquido (Raina, 1997). La inclusión de Ficoll-400, un polímero sintético de alto peso molecular derivado de la sacarosa, como agente gelificante mejoró notablemente la producción de plantas verdes (Zhou et al., 1991; Zhou et al., 1992). El Ficoll-400 crea un medio semisólido que permite mayor disponibilidad de nutrientes, además de evitar el hundimiento de los embrioides y callos evitando así una posible anoxia (Zhou et al., 1992).

Otras sustancias orgánicas como las vitaminas, los ácidos orgánicos y el mioinositol, son nutrientes que mejoran el crecimiento y la morfogénesis (George et al., 1995). En algunas especies se usan bloqueadores de la síntesis de etileno. En el caso de la cebada ocurre todo lo contrario: el etileno que se produce en las anteras estimula la embriogénesis (Cho and Kasha, 1989). También se suele usar carbón activo con intención de absorber del medio sustancias tóxicas provenientes de la oxidación de fenoles.

Generalmente se utiliza un rango de pH entre 5.8 y 6.0

1.2.4 Selección *in vitro*

La selección de líneas celulares *in vitro* consiste en la evaluación de una población para identificar individuos que bajo la presencia de un agente selectivo muestren una determinada característica genética.

La selección *in vitro* proporciona una serie de ventajas frente al cultivo de plantas completas, como:

- El menor gasto de sustancias selectivas, tiempo, espacio y dinero.
- Las condiciones ambientales están más controladas y no existe interacción con la propia fisiología de la planta madre,
- Se crean nuevas combinaciones alélicas, generando una nueva variabilidad que se puede identificar, seleccionar y pasar a la siguiente generación en un corto espacio de tiempo.

Aunque también presenta una serie de desventajas:

- No todas las especies se pueden regenerar fácilmente.
- Necesidad de personal y equipo más sofisticado.
- Resulta inapropiado cuando el agente selectivo debe aplicarse sobre planta completa.
- Las condiciones ambientales son artificiales pudiéndose no darse en el campo las características *in vitro* (Bright and Jones, 1985).

Durante los años 80 la metodología de selección *in vitro* experimentó un gran auge si bien no se obtuvieron, en esa década, resultados más allá de los centros de investigación (Flowers, 2004). En todos los ensayos de selección *in vitro* una de las cuestiones limitantes es qué grado de correlación existe entre los resultados en condiciones “artificiales” y las naturales. Para comprobar la estabilidad de la resistencia

es necesario realizar ensayos multilocales en años sucesivos con una alta presión de selección (Remotti, 1998).

A partir de los años 90 empezaron a conseguirse cultivares producidos por variación somaclonal y mutagénesis (Zhu et al., 2000). Actualmente muchas publicaciones han demostrado correlaciones útiles entre las respuestas *in vitro* y la expresión de los caracteres en el campo, generalmente en resistencias a enfermedades. En distintos trabajos se ha encontrado una excelente correlación entre la resistencia a patógenos a nivel de planta y la insensibilidad a toxinas a nivel celular (van den Bulk, 1991; Rai et al., 2001). También existen buenos resultados para tolerancia a herbicidas, metales, sales y bajas temperaturas (Swanson et al., 1989; Chowdhury et al., 1998; FAO, 2004; Rippert et al., 2004).

Existen diversos trabajos donde se recoge la posibilidad de realizar una selección en el estadio de microspora ya que muchos de los genes que se transcriben durante el desarrollo del polen también lo hacen en las partes vegetativas de la planta (Verma et al., 1988). La diferencia entre el desarrollo de un embrión cigótico y la de un embrión somático radica en la falta del endospermo que caracterizan al primero (Palmer et al., 2005).

1.3 ESTRÉS ABIÓTICO: LA TOXICIDAD POR BORO

Se ha estimado que cerca del 13% de las tierras cultivadas y el 33% de las irrigadas se hayan bajo estrés salino, y es más, las áreas salinas se están incrementando en un ratio anual del 10% por causas como: baja precipitación, alta evaporación superficial, disgregación de las rocas nativas, irrigación con aguas salinas y prácticas de cultivo no sostenibles. Por ello la obtención de variedades de cultivos resistentes a estos ambientes podría ayudar a convertir estas zonas en campos productivos (Jain, 2005).

Una de las mayores limitaciones de la producción mundial de cereales se debe a la deficiencia o toxicidad de boro en el suelo. Es uno de los micronutrientes esenciales para el crecimiento de las plantas y el intervalo de concentración que marca la diferencia entre la aparición de efectos tóxicos y su deficiencia es muy estrecha (Rozema et al., 1992). Mientras que la deficiencia es fácilmente corregida mediante la adición de fertilizantes, la toxicidad presenta una solución difícil y económicamente no sostenible. La toxicidad por boro es un desorden nutricional ampliamente distribuido en el mundo que presenta un impacto negativo en los cultivos. Se han citado pérdidas de rendimiento de entre el 10 y el 17% en cultivos de cebada en Australia debido a las altas concentraciones de este elemento en el suelo (Cartwright et al., 1986; Brennan and Adcock, 2004). En cebada, la aparición de quemaduras y necrosis en las puntas y márgenes foliares, junto con la gran reducción en rendimiento en grano y producción de materia seca son los principales síntomas y efectos del exceso de boro (Gupta, 1977; Gupta et al., 1985).

En esta sección se discutirán las funciones principales del boro en plantas, como afecta su exceso y qué medidas se pueden tomar para remediarlo.

1.3.1 Química del boro

EL boro es el único no-metal entre los elementos del grupo III de la tabla periódica. En solución acuosa se comporta como un ácido débil y en los suelos neutros a ácidos, en los que preferentemente se producen los cultivos, nos lo encontraremos en forma no disociada (Raven, 1980)

El boro se distribuye en el medio ambiente de diferentes maneras. La concentración de boro en el aire, en forma de sasolita, proviene de erupciones volcánicas o de plantas energéticas de carbón (constituye una de las principales fuentes de contaminación del aire). En agua se encuentra en forma de borato, como BO_2^{-2} o BO_3^{-3} . En agua dulce nos encontramos concentraciones de 5 a $10\mu\text{g/L}$, en agua salada continental de 1 a 3mg/L , en mar $4,5\text{mg/L}$, y en lagos salados entre 100 y 500mg/L (Zhu and Wang, 2007).

El suelo contiene como media unos $10\text{-}300\text{mg/kg}$, dependiendo de su tipología, contenido en materia orgánica y régimen pluviométrico (Goldberg, 1997). Las mayores concentraciones se dan en evaporitas marinas y sedimentos arcillosos marinos. En los suelos el boro se presenta como una sustancia marrón oscura a negra, en tres formas (Sartaj and Fernandes, 2005):

- Mineral: borosilicatos, boro-alumino-silicatos y boratos.
- Adsorbido en minerales arcillosos e hidróxidos de aluminio y hierro.
- En la materia orgánica.

La correlación que existe entre contenido de boro en el suelo y la concentración en plantas ha servido como sistema “chivato” de minas de este elemento (Zhu and Wang, 2007).

La deficiencia se da en suelos con textura laxa, donde el boro soluble en agua rápidamente se ve lixiviado y por tanto no disponible para las plantas (Blevins and Lukaszewski, 1998). El boro se absorbe en las raíces en forma de ácido bórico desde la solución del suelo.

1.3.2 Zonas geográficas afectadas.

Las áreas con alta concentración de este no metal en el suelo son menos numerosas que en las que existe deficiencia de este elemento. Las áreas más afectadas por un exceso de boro son las regiones áridas y semiáridas del planeta: zonas secas del sur australiano, la costa oeste de Malasia, la costa sur de Perú, la zona norte de los Andes chilenos, suelos solonchaks de la antigua URSS, ferrasoles de India, rendzinas de Israel, en California y toda la zona denominada WANA (West Asia- North Africa) (Nable et al., 1997).

1.3.3 Origen y soluciones para la toxicidad por boro.

Las causas por las que se producen altas concentraciones de este mineral tienen tanto origen natural como antropogénico. Entre ellas se destacan los suelos de origen marinos, la irrigación de cultivos y el asentamiento de cenizas de minas y de industrias químicas (Nable et al., 1997). Las actividades que contribuyen a la formación de suelos con alto contenido en boro son:

- Agua de riego con contenido en boro. El agua con alto contenido en boro se encuentra en regiones salinas o en el agua desalinizada de mar. Se suele usar en casos de deficiencia de boro. El problema es que la cantidad de este elemento que puede adsorber el suelo puede ser sobrepasada con lo que se provoca un problema de toxicidad (Jame et al., 1982).
- Minería a cielo abierto. Se producen oxidaciones de minerales con contenido en boro y luego éste pasa a la solución acuosa.
- Cenizas producidas por centrales eléctricas. Se han encontrado concentraciones de hasta 700mg/kg en estas cenizas (James et al., 1982).

- Productos industriales. El boro tiene gran cantidad de aplicaciones, entre ellas destacan la manufacturación de porcelanas, fertilizantes, producción textil y de cueros, y como agente blanqueante en productos de limpieza. Sus restos son comúnmente descargados al medio ambiente.

La mejora de los terrenos con alto contenido en boro pasa por:

- Lixiviación con agua. Debe realizarse de tal manera que sea suficiente para eliminarlo pero no tanto como para percolar otros nutrientes esenciales para las plantas. Además hay que tener en cuenta de donde proviene el exceso, ya que, por ejemplo, el boro introducido por el riego es más fácil de solubilizar que el propio de los minerales de la zona. El proceso de recuperación de un suelo con alto contenido de boro exige tres veces más agua que el de un suelo salino (Keren et al., 1985).
- Enmiendas. La absorción del boro es pH dependiente, por lo tanto aumentar el pH mediante lechadas (enmiendas cálcicas) es una solución temporal (Bartlett and Picarelli, 1973). En tierras sódicas se suele usar yesos, mientras que en suelos ácidos sulfatos cálcicos. De todas maneras con el tiempo se produce su reabsorción. La aplicación de cal no es viable para suelos alcalinos, ya que lo que se pretende es aumentar el pH para aumentar el secuestro de boro por el suelo. Otro sistema de enmienda es cubrir los primeros 50-70cm de terreno con suelo con bajo contenido en boro.
- La desalinización de agua de mar o potabilización del agua salina contaminada mediante un sistema de osmosis inversa resulta útil para tipos de agua con una leve o baja concentración de boro (Redondo et al., 2003). Actualmente se están implementando métodos de osmosis inversa con sistemas multifase para poder desalinizar aguas con alto contenido de este no metal (Turek et al., 2007). Los estándares aceptados por la Unión Europea de contenido en boro en agua potable o de riego son de 0.5mg/L, y de 0.3 para la OMS (Organización Mundial de la Salud). Esta limitación viene impuesta por los efectos que tiene tanto sobre seres humanos y animales (efectos teratógenos) como para plantas (reducción de la cosecha, detrimento en la calidad o incluso muerte de la planta, de hecho los cítricos solo soportan una concentración de 0.3mg/l en el agua de riego.) Se han desarrollado múltiples sistemas de desalinización de agua de mar para poder alcanzar una correcta eliminación del boro y conseguir que sea una técnica competitiva económicamente (Redondo et al., 2003).
- Gestión vegetal. Una buena gestión de especies vegetales con altos requerimientos de boro, un buen manejo del agua de riego (Bañuelos et al., 1993) y la creación de programas de mejora vegetal para tolerancia son los nuevos puntos de mira para lidiar con el problema de su toxicidad (Yau and Ryan, 2008; Hassan et al., 2010).

1.3.4 El boro en las plantas. Funciones.

La primera noticia de su presencia en plantas es de 1857 (Ploquin, 1967). Veinte años después se comenzó su uso como conservante alimentario con propiedades tanto conservadoras del sabor como de aumento de longevidad de la comida, teniendo esta aplicación un gran papel en la Primera Guerra Mundial. A principios de siglo XX se comenzó a estudiar sus efectos en la salud, que resultaron ser perjudiciales, y a partir de los años 20 se empezó a legislar en contra del uso del borato de sodio y el ácido bórico como preservante de alimentos, aunque no se aplicó dicha normativa hasta los años 50

como consecuencia de las necesidades de aprovisionamiento en la Segunda Guerra Mundial.

En 1923, Warington concluye que el boro es un elemento esencial para plantas que debe ser administrado de forma continua, y en 1926, se establece para cebada (Sommer and Lipman, 1926). Actualmente existen evidencias circunstanciales de que también es esencial para animales aunque el hecho de no encontrar una función bioquímica concreta no permite determinarlo como tal (Nielsen, 2008).

Se distinguen tres tipos de plantas según el grado de requerimientos de boro:

- Gramíneas
- Dicotiledóneas y algunas gramíneas.
- Las plantas secretoras de látex.

Funciones :

- **Pared Celular**

El boro es un agente morfogénico que afecta al desarrollo y diferenciación de la pared celular (PC) de plantas superiores. Este elemento se distribuye como: boro soluble en agua y boro insoluble. Resulta ser un componente de los polímeros pécticos en monocotiledóneas acuáticas, dicotiledóneas, gimnospermas, y monocotiledóneas gramíneas (Hu and Brown, 1994; Hu and Brown, 1997; Kobayashi et al., 1997). Suele aparecer complejo con los glúcidos, sobre todo junto a la apiosa en la red de ramnoarabinogalactano II (Loomis and Durst, 1992; Matoh, 1997)), o con la ribosa, el manitol y el sorbitol (Reid et al., 2004),

- **Membrana plasmática**

Actualmente ya no se contempla al boro como un simple componente estructural de la PC, sino también como una posible señal celular y estabilizador de moléculas con grupo *cis*-dioles, como por ejemplo las glicoproteínas de membrana (Camacho-Cristobal et al., 2008).

En cuanto a sus funciones en la membrana plasmática se sabe que su adición en plantas deficitarias provoca en zonas las radicales: hiperpolarización de las membranas, estimulación de la liberación de protones por la bomba protónica-ferricianida dependiente, actividad ATPasa (Adenina trifosfato sintasa), NADH oxidasa (nicotinamida adenina dinucleótido) y transporte iónico; por lo que se ha sugerido que el boro afecta a las propiedades físicas de la membrana (Camacho-Cristobal et al., 2008).

El trabajo de (Shkolnik, 1984) indica que varios enzimas de membrana son afectados bajo condiciones deficitarias de este elemento en dicotiledóneas, lo que conllevaría un menor crecimiento de la planta por alteración del metabolismo y síntesis de compuestos fenólicos. Estas enzimas incluyen ribonucleasas, glucosa-6-fosfato deshidrogenasas, fenilalanina amonio liasa, glucosidasas y polifenoloxidasas.

Aunque las cantidades de boro no ligado a la pared celular son bajas, son lo suficientemente significativas en cuanto a implicación en la absorción de iones. El boro afecta al equilibrio de absorción y exclusión de iones potasio, fósforo y cloro. (Blevins and Lukaszewski, 1998)

- **Metabolismo**

Se ha sugerido la implicación del boro en procesos como la estimulación de la producción de ascorbato, de las auxinas, y el bloqueo de la inhibición del crecimiento de raíz provocada por el aluminio en plantas no gramíneas. Se ha especulado que la caída de pH provocada por las auxinas permite la elongación celular debido a la sensibilidad

ácida de los boratos, consiguiendo la rotura de los entrecruzamientos de la fracción péctica (Power and Woods, 1997).

Se ha demostrado que se mueve vía floema hacia los tejidos sumideros mediante su complejamiento con polioles como el sorbitol. Este movimiento es especie-dependiente y ocurre en aquellas especies donde estos azúcares constituyen los fotosintetizados principales (Brown and Shelp, 1997).

- **Polen**

Las necesidades de boro de las gramíneas en periodo reproductivo son más altas que en otro tipo de plantas. Su deficiencia puede producir esterilidad y malformaciones durante el desarrollo floral.

Este elemento influye en la germinación del polen, se da en una muy alta concentración en los órganos florales femeninos existiendo un gradiente creciente desde el estilo hasta el ovario (Gauch and Dugger, 1954). También se ha visto que actúa como agente quimiostático en la formación del tubo polínico, además de complejarse con materiales celulares para su formación.

- **Fijación de Nitrógeno**

Se ha observado el efecto de boro sobre la fijación de nitrógeno: su deficiencia provoca la disminución del desarrollo de los nódulos (o incluso no llegan a formarse) y del propio proceso de fijación de nitrógeno.

Se ha sugerido que estabiliza la capa glicolípídica interior de la envuelta de los heterocistos retardando de esta manera la difusión de O_2 , evitando así la destrucción de la nitrogenasa, enzima clave en la fijación de N_2 . La deficiencia de boro provoca una reducción del número de nódulos, disminución de la fijación de nitrógeno y de las conexiones vasculares con el nódulo, pudiéndose incluso transformar las relaciones bacteria-planta en parasítica (Blevins and Lukaszewski, 1998).

- **Deficiencia de boro como señal intracelular**

Existen tres teorías de cómo pasa la señal de deficiencia de boro al núcleo (Camacho-Cristobal et al., 2008).

- El boro causa un desequilibrio redox con lo que una señal pasa rápidamente de la PC al núcleo.

- Existe una cascada mecánica desde la PC a la membrana plasmática, pasando por el citoesqueleto, con posible actuación de las proteínas arabinogalactano.

- El propio boro es una señal que interactúa con los factores de transcripción.

1.3.5 Absorción del boro.

La absorción del boro parece ser tanto un proceso activo como pasivo. Actualmente no existe un consenso sobre cuál de ellos tiene mayor peso en la absorción de este elemento. Sutton et al. (2007) identificaron el gen *Bot1* en cebada que codifica un transportador relacionado con transportadores de bicarbonato en animales (bomba de exclusión). Se consideran tres tipos de mecanismos para su absorción en las raíces (Tanaka and Fujiwara, 2008):

- Proceso pasivo: Se ha calculado tanto teóricamente (Raven, 1980) como experimentalmente (Brown et al., 2002) el coeficiente de permeabilidad del ácido bórico a través de la membrana indicando que es posible este proceso pasivo, aunque no explique la totalidad del boro intracelular.

-Transporte facilitado por canales MIP (Major Intrinsic Proteins): descubiertos gracias a los estudios en los que se describe una inhibición del transporte de boro en las membranas a causa de la adición de agente bloqueantes de canales como la floratina y el cloruro mercurico. Ejemplos de esos canales son las PIP1 en maíz, AtNIP5;1 en *Arabidopsis* y las OsNIP3 en arroz.

-Transporte activo: también encontrados mediante ensayos con inhibidores metabólicos y tratamientos con frío. Ej: gen *OsBOR1* de arroz y el gen *HvBot1* de cebada. El trabajo de Sutton et al. (2007) corrobora la teoría de la exclusión como principal agente de tolerancia a su exceso. Sin embargo, después de la introgresión de este gen principal (Paull et al., 1991; Hayes and Reid, 2004) que codifica un transportador de boro en las raíces, no se ha conseguido germoplasma útil en condiciones de campo. Se ha sugerido que la no mejora del material vegetal es debida a la cosegregación de *Bot1* con genes no deseables o que carecen de interés agronómico.

Una vez en la raíz, el boro es cargado en el xilema mediante trasportadores BOR hacia el tallo siguiendo la corriente de transpiración (Camacho-Cristobal et al., 2008).

1.3.6 Efectos fisiológicos y toxicidad.

1.3.6.1. SINTOMAS

La toxicidad de boro ejerce diferentes efectos en muchos procesos en plantas vasculares, como son: la alteración del metabolismo, reducción de la división celular radicular, disminución del contenido de RNA, de clorofila en hojas y de la fotosíntesis, decrecimiento de los contenidos de lignina y suberina, etc. (Nable et al., 1997; Reid, 2007). De manera general la planta expuesta a grandes concentraciones experimenta una disminución del crecimiento de tallos y raíz (Nable et al., 1990). Normalmente se considera no toxica, es decir., que permite un crecimiento normal de la planta, una concentración de boro extraíble en suelo de 0.5–5.0 mg/kg (Bell, 1997). En la Tabla 1.1 se exponen la tolerancia de diferentes cultivares.

Tabla 1.1. Tolerancia relativa de diferentes cultivos y ornamentales a boro (la tolerancia disminuye a medida que se desciende en la columna). La tolerancia está basada en la concentración de boro en agua de riego en la que se observaron los síntomas de toxicidad por boro, creciendo las plantas en arena. No necesariamente indica reducción en el rendimiento.

Tolerante	Semitolerante	Sensible
4,0 mg B/L	2.0 mg B/L	1,0 mg B/L
Espárrago	Girasol	Nuez
Dátil	Patata	Ciruelo
Palma	Algodón	Peral
Remolacha	Tomate	Manzano
Alfalfa	Olivo	Uva
Gladiolo	Cebada	Cerezo
Cebolla	Trigo	Melocotón
Nabo	Maiz	Naranja
Lechuga	Calabaza	Aguacate
Zanahoria	Pimiento	Limonero
2.0 mg B/L	1.0 mg B/L	0,4 mg B/L

No parece existir una única causa que provoque la toxicidad del boro, más bien se trata de un conjunto de modificaciones metabólicas y estructurales. Podemos decir que se considera que la toxicidad de boro se actúa en tres frentes:

- Interrupción del desarrollo de la PC.
- Interrupción del metabolismo, mediante la unión a la ribosa de diversas moléculas como ATP, NADH o NADPH.
- Interrupción de la división celular y el desarrollo celular, por unión a la ribosa libre o del RNA.

Existen estudios contrapuestos en cuanto a si influye o no en los niveles de ATP, NADH y NADPH. En todo caso parece ser que la disminución del aporte energético que se produce para los rangos de toxicidad en los que se inhibe el crecimiento no es lo suficientemente limitante como para provocarlo. En *Vicia faba*, al aumentar la concentración de boro, el índice mitótico en las raíces disminuye y aumenta el número de mitosis anormales. Parece probable que este elemento tenga influencia en la mitosis en la síntesis de DNA, RNA o de proteínas esenciales para aquella.

En tejidos maduros lo más probable es que altas concentraciones de boro impidan la capacidad de neutralizar el daño oxidativo y que esto esté altamente influenciado por otros estreses ambientales que lo acompañen como sequía, salinidad, alta intensidad lumínica, altas temperaturas, etc. (Reid et al., 2004). En Australia no se descubrió la existencia de la toxicidad en el territorio hasta una grave sequía que tuvo lugar en 1982. Se sugirió la existencia de interacción entre ambos estreses debido a que el boro se acumula en las capas bajas del suelo. Así, en épocas húmedas, las plantas no se ven obligadas a explotar las zonas inferiores ya que pueden obtener suficiente agua de las capas superiores; pero en épocas secas ocurre lo contrario: las raíces exploran zonas más profundas en busca de humedad y es ahí cuando comienzan a desarrollar síntomas de toxicidad a medida que crecen en profundidad (Yau, 2002).

De un modo generalista, se refiere que la acumulación de boro sigue un modelo acropétalo, desde la base a la punta de la planta, apareciendo los síntomas primeramente en hojas viejas en forma de manchas cloróticas y/o necrosis en la punta y márgenes foliares (Eaton, 1940; Roessner et al., 2006). Los síntomas de toxicidad son diferentes en especies en las que el boro es un elemento inmóvil o móvil en el flujo floemático. En gramíneas y especies donde este elemento es inmóvil suelen aparecer manchas amarillas o marrones en las puntas de las hojas que se pueden extender por los márgenes del foliolo y producir necrosis localizada o de toda la hoja. Algunos ejemplos están descritos en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2 Descripción de síntomas foliares en varios cultivos.

Cultivo	Descripción de los síntomas
Cebada	Aparecen pequeñas lesiones marrones en las puntas y márgenes de las hojas viejas, también amarilleamiento.
Colza	Aparecen parches amarillos y necróticos en los márgenes de las hojas
Guisantes	Amarilleamiento y posterior necrosis desde los márgenes hacia el interior de las hojas viejas.
Garbanzos y lentejas	Muerte de las hojas viejas y caída.
Trigo	Amarilleamiento de las puntas de las hojas más viejas, progresando hacia la base y los márgenes. Pueden aparecer puntos amarillos más tarde.

En humanos los signos de toxicidad aguda y/o crónica incluyen náuseas, vómitos, diarrea, pérdida de peso, dermatitis, letargo, disminución de apetito sexual, número y motilidad del espermatozoide. (Nielsen, 1997)

1.3.6.2. PROCESOS QUE MITIGAN LA TOXICIDAD

Desde el descubrimiento de la existencia de la toxicidad del boro se han argumentado, desde un punto de vista fisiológico, diferentes mecanismos que mitigan sus efectos: (Hu and Brown, 1997)

- Gutación.
- Lixiviado a causa de la lluvia.
- Redistribución de boro en las hojas.
- Diferencias en las necesidades de boro de las diferentes especies.
- Estructura de la PC de la raíz.
- Exclusión de boro por las raíces “bomba de exclusión”.

Los efectos de la gutación son difícilmente cuantificables. Se contemplaba la posibilidad de que la gutación fuese otro mecanismo para su detoxificación, además de la expulsión desde las células al apoplasto o de su lixiviación por la lluvia. Sin embargo, los datos aportados en el trabajo de Reid et al. (2009) apuntan a que este mecanismo de eliminación del exceso de agua en plantas parece no tener una gran relevancia en el alivio de la toxicidad.

Las correlaciones entre los síntomas foliares y el contenido de boro de las hojas, y entre el contenido de boro foliar y el rendimiento, se han definido como bajas en varios trabajos. Se considera que estas malas correlaciones pueden ser debidas a la cuantificación de boro en plantas expuestas a su lixiviación consecuencia de mojarse las hojas por efecto de la lluvia o en plantas regadas por aspersión (Nable et al., 1990; Torun et al., 2003). Sin embargo, existen estudios que indican lo contrario, apuntando que si no existe correlación es por un posible fallo experimental o a que no toda la resistencia en todos los genotipos se debe únicamente a las diferencias en su acumulación (Nable, 1988; Paull et al., 1992; Torun et al., 2006).

El complejamiento del boro mediante polioles como mecanismo de tolerancia interno parece reducirse a un cierto número de especies halófitas (Rozema et al., 1992). Además se ha considerado que la inmovilidad floemática mantiene el exceso de este elemento en los márgenes foliares, lejos de los sitios con más actividad metabólica. Otro mecanismo propuesto fue la compartimentación en diferentes partes de las células o tejidos, pero se vio que el modelo de distribución no difería significativamente entre las plantas tolerantes y sensibles (Nable et al., 1997). La redistribución celular de su exceso hacia el apoplasto también se ha propuesto como mecanismo de alivio. Se ha argumentado que las plantas tolerantes pueden translocar del simplasto al apoplasto el exceso de boro, pudiendo alcanzar concentraciones foliares tres veces mayores las tolerantes que las intolerantes antes del desarrollo de síntomas (Reid and Fitzpatrick, 2009).

Se ha considerado el efecto del grado de transpiración en la absorción de boro, y por tanto en su toxicidad (Raven, 1980). Sin embargo en estos estudio no se tenían en cuenta la expulsión activa de boro en las raíces y finalmente se concluyó que las diferencias en la tolerancia no podían ser explicadas solamente mediante el control del grado de transpiración (Nable, 1988).

Se propuso que la composición de la PC podría tener también un efecto de detoxificación (Nable, 1988). Un aumento de la cantidad de cis-dioles que lo

secuestrasen en la PC radicular podría ayudar a la disminución de los síntomas, aunque no se ha presentado hasta la fecha ningún trabajo al respecto.

De forma general el crecimiento radicular se inhibe a medida que aumenta su concentración, viéndose los genotipos sensibles más afectados que los resistentes. Sin embargo, parece que la longitud radicular no es un buen sistema de predicción de tolerancia a boro (Reid, 2010), a pesar de estudios anteriores donde se comentaba que las diferencias en el crecimiento de las raíces o de su morfología podría constituir la base de la tolerancia en algunas situaciones (Eglinton et al., 2004). Se ha determinado que el modo de crecimiento de las raíces en suelos con altas cantidades de este mineral es impredecible, como sucede con el cultivar Sahara3771. Sahara3771 presenta un alto crecimiento radicular en niveles medios de toxicidad de boro, cuando se esperaría que la masa radicular fuese disminuyendo. La estrategia que se ha propuesto para este tipo de crecimiento es que puede resultar mejor estrategia aumentar la masa radicular en zona superior que colonizar las zonas inferiores de subsuelo. Además se comprobó que este crecimiento superficial no alteraba la eficiencia de uso de agua (Choi et al., 2006).

Se sabe que tanto en cebada como en trigo la tolerancia a boro está relacionada con su baja acumulación en el tallo (Cartwright et al., 1986; Nable, 1988; Nable et al., 1990). Hayes y Reid (2004) publicaron un trabajo donde se comprobó que el cultivar tolerante de cebada Sahara 3771 era capaz de mantener niveles inferiores de boro en la raíz en comparación con genotipos sensibles, y que esto repercutía en un menor nivel en el xilema y en tallo. Estas diferencias se atribuyeron a un transporte activo desde las raíces ya que en el ensayo no se encontraron diferencias en la permeabilidad de la membrana para el borato y se utilizaron inhibidores metabólicos. Se concluyó que en cebada existe correlación entre la concentración intracelular de boro y el nivel de toxicidad, y que el proceso de tolerancia estaba mediado por una bomba de exclusión de este elemento en las raíces. Se proponen dos modelos de eflujo, un intercambiador de aniones y un transportador permeable a aniones (Hayes and Reid, 2004) como se muestra en la Figura 1.2:

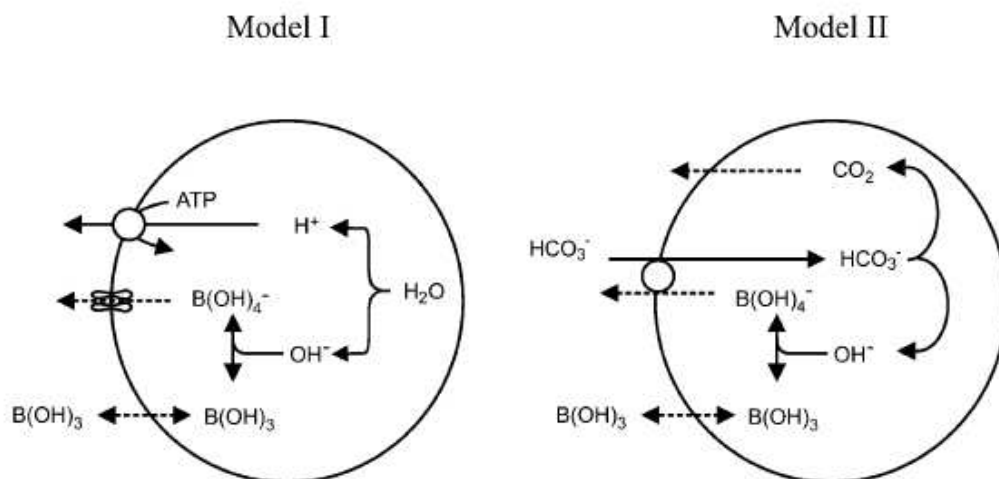


Figura 1.2. Dos modelos de eflujo de boro como base de tolerancia en cebada. En el modelo I, el eflujo de $B(OH)_4^-$ se lleva a cabo mediante un transportador permeable a aniones a través de la diferencia de potencial negativa de la membrana, el bajo pH externo y dirigido por el gradiente de concentración. Se requiere energía para las bombas de protones para evitar la despolarización de la membrana plasmática debida al flujo de aniones y para prevenir la acidificación del citoplasma. En el modelo II, el eflujo de borato ocurre por intercambio aniónico. Si el anión es HCO_3^- no es necesaria la compensación de cargas y la estabilidad el pH se consigue mediante la disociación en OH^- y CO_2 en el citoplasma. Las líneas punteadas indican movimiento pasivo.

Aunque el transportador no fue caracterizado, Reid et al. (2007) enumeraron los atributos que deben tener estos transportadores para poder cumplir su función:

- Necesidad de aporte energético. En levaduras la expulsión de boro parece ser mediada por el gradiente electroquímico protónico de la membrana plasmática (Jennings et al. 2007).
- El transportador opera en altas concentración e boro, i.e., es un transportador de baja afinidad por sustrato.
- Debe localizarse en la membrana plasmática de las células epidérmicas o corticales externas.

Los primeros transportadores de boro descubiertos fueron los AtBOR1 en *Arabidopsis*, que actúan bajo deficiencia de boro, incrementando su aporte hacia los tallos mediante la carga desde el parénquima xilemático al xilema, y posteriormente redistribuyéndolo desde el simplasto al apoplasto para ayudar al desarrollo local de la PC (Takano et al., 2002). Actualmente se conocen otros seis genes en *Arabidopsis* (Miwa et al., 2006) y cuatro en arroz que actúan en diferentes condiciones de nutrición de boro (Nakagawa et al., 2007). En *Arabidopsis*, BOR1 es un transportador de borato necesario para su transporte desde las raíces hasta el tallo en bajo estrés por deficiencia de boro. En condiciones de toxicidad, BOR1 es degradado vía endocitosis y su sobreexpresión no resulta en una mejora del crecimiento de la planta (Miwa et al., 2006). Estos resultados demuestran que BOR1 no está implicado en la tolerancia de boro en *Arabidopsis*, sin embargo existe otro transportador en *Arabidopsis*, el BOR4, que no se degrada en el nivel postranscripcional (Miwa et al., 2007) que sí está correlacionado con la tolerancia, al igual que el BOR2 en cebada y trigo. En el caso de la cebada, se ha encontrado en las variedades Sahara y Clipper un ortólogo del gen BOR1, el Bot1 que condiciona la tolerancia a boro.

Por tanto, Los mecanismos que se postulan como principales promotores de tolerancia son la reducción de la translocación al tallo y la exclusión desde las raíces (Shu et al., 1991; Brown and Hu, 1994; Pfeffer et al., 1999).

1.3.7 Genética de la tolerancia a la toxicidad por boro.

La base genética de la tolerancia a la toxicidad de boro en cebada se examinó en una población DH derivada del cruzamiento de un cultivar resistente, Sahara 3771 y del cultivar Clipper, sensible a al exceso de este elemento y con buen comportamiento agronómico. Se identificaron cuatro QTL's en los cromosomas 2H, 3H, 4H y 6H. La región del cromosoma 2H resultó estar asociada a la expresión de síntomas foliares, la del 3H con la disminución del crecimiento radicular en condiciones de toxicidad, la del 4H con la absorción de boro, respuesta del crecimiento radicular, producción de materia seca, y expresión de síntomas foliares, y por último, el QTL del cromosoma 6H, que también se relacionó con la absorción de boro aunque con un efecto menor que el del 4H (Jefferies et al., 1999). Los QTL de los cromosomas 2H y 4H fueron validados en la población Sloop x DH31(Clipper x Sahara progeny) (Jefferies et al., 2001)

En trigo panadero, la tolerancia a exceso de boro está controlada por lo menos por tres genes independientes, BoT1, BoT2 y BoT3, que actúan de manera aditiva y con dominancia incompleta (Paull et al., 1991; Paull et al., 1992). Se han mapado tres regiones en los cromosomas 4A, 7B y 7D relacionadas con la tolerancia. Paull et al. (1991) propusieron la existencia de un cuarto locus, todavía no identificado, debido a la existencia de segregación transgresiva entre los genotipos tolerantes G61450 y Halberd en los que se encontraron los otros tres loci. De manera complementaria, Jefferies et al.

(2000) encontraron que el cultivar Kenya Farmer y la línea de mejora Warigal x MMC presentaban significativamente más síntomas foliares que en estudios anteriores con lo que se confirmaría la existencia de este locus adicional relacionado con la expresión de lesiones foliares. Los genes BoT1 y BoT2 también han sido identificados en trigo duro (Jamjod et al., 1997).

Los tres QTL de trigo están ampliamente reconocidos. El primer estudio sobre la identificación de estas tres regiones en los cromosomas 7B, 7D y 4A envueltas en la tolerancia a boro en trigo lo realizó Paull et al. (1990) mediante un análisis genético con aneuploides en la población Federation y Halberd (moderadamente tolerantes) y el cultivar G16450 (muy tolerante). Paull (1990) propuso genes de tolerancia en un germoplasma exótico, GK1450, una línea griega, localizándolos en los cromosomas 4A y 7D. Usando las series monosómicas Condor, Chantacume (1995) también identificó el QTL del 4A. No detectó el 7D ya que no se realizó un análisis de los síntomas foliares, carácter al que está asociado dicho QTL. La identificación de las regiones responsables de la variabilidad en la tolerancia se realizó con marcadores AFLP y RFLP en la población resultante del cruzamiento entre Cranbrook x Halberd (Jefferies et al., 2000). Se encontró que las regiones de los cromosomas 7B y 7D estaban asociadas con la expresión de síntomas foliares. El QTL del 7B también resultó asociado al control de la absorción y a una reducción del efecto de la toxicidad en el crecimiento de la raíz.

Un locus principal para reducción de la acumulación de boro en el tallo en el brazo largo de cromosoma 4A fue derivado de la accesión de trigo panadero AUS4612 (Greek G61450) y mostró ligamiento a XksuG10-4AL (Paull et al., 1993). Un segundo locus mayor de tolerancia (Bo1) en el brazo largo del cromosoma 7B cosegregó con el marcador molecular codominante STS (Sequence Tagged Site) Xaww5L7 en la población DH obtenida del cruce entre Cranbrook y Halberg. EL marcador STS AWW5L7 probó ser muy predictivo de la presencia de Bo1 en un conjunto de 94 cultivares australianos de trigo panadero (Schnurbusch et al., 2007).

Los marcadores RFLP de los cromosomas 7B y 7D se mostraron efectivos en la selección para mejora a tolerancia a boro en un background genético diferente. El locus relacionado con mejora de crecimiento radicular en condiciones de toxicidad, en el cromosoma 7B, se transfirió con éxito en el cultivar Schomburgk mediante ciclos de retrocruzamiento con selección para vigor bajo estrés tóxico. El nuevo cultivar tolerante a boro, BT-Schomburgk, presentó un rendimiento mejorado en un 11% (Moody et al., 1993).

Paull et al. (1995) testaron la población derivada del cruzamiento entre G61450 (muy tolerante) y Kenya Farmer (muy sensible). Encontraron una asociación significativa entre el RFLP XksuG10 localizado en el grupo homeólogo 4 en trigo y en el 4H en cebada (Jefferies et al., 1999) con lo que se empezó a creer que el trigo y la cebada compartían loci comunes para la tolerancia a boro. Existen loci comunes entre el trigo y la cebada para importantes caracteres agronómicos como son la respuesta al fotoperiodo, vernalización y contenido de proteína en grano. La identificación del gen Bot1 en el cromosoma 4H en cebada dio pie a pensar en la posibilidad de encontrar este gen en el cromosoma 4A en trigo panadero que constituye su homeólogo. Sin embargo, se ha mapado en el brazo largo del cromosoma 5A, que presenta una antigua translocación recíproca con el cromosoma 4A (Miftahudin et al., 2004). El uso de líneas de adición de trigo-cebada permitió confirmar que el transportador HvBOR2 está localizado en el cromosoma 4, sin embargo no se conoce la localización del TaBOR2. El mapeo fino del locus BoT1 relacionado con la tolerancia en trigo en el cromosoma 7B ha fallado en la búsqueda de genes que puedan codificar una proteína de transporte de membrana (Reid, 2007). No se han encontrado otros genes de cebada del tipo BoT1

en los grupos cromosómicos 5 o 7 de trigo indicando que esta familia génica no está envuelta en la tolerancia a boro en regiones cromosómicas conocidas en trigo (Schnurbusch et al., 2008).

Tabla 1.3 Cromosomas de cebada y trigo donde se han validado los genes *BoT1*, *BoT2* y *BoT3*.

Cromosoma	Especie	Referencia
2H, 3H, 4H y 6H	Cebada	Jefferies et al.(1999)
2H, 3H, 4H	Cebada	Karakousis et al.(2003)
2H y 4H	Cebada	Jefferies et al., (2001)
4A, 7B y 7D	Trigo panadero	Paull et al. (1991); Paull et al. (1992)
7B y 7D	Trigo duro	Jamjod et al., (1997)
4A	Trigo panadero	Chantacume (1995)
7B y 7D	Trigo panadero	Jefferies et al., (2000)

• El 4H

Los genes identificados en raíces de cultivares de trigo y cebada tolerantes han sido clonados. Estos genes expresan proteínas que presentan similitudes con transportadores de boro de *Arabidopsis* y arroz. La expresión de estos genes está fuertemente correlacionada con la habilidad de los genotipos tolerantes de disminuir la concentración de boro en las raíces. El gen de cebada se localiza en el cromosoma 4H, esta correlacionado con baja acumulación de boro en los tallos en condiciones de alto aporte de este elemento (Jefferies et al., 1999).

El locus *Bo1* de trigo se localiza en el cromosoma 7B (Jefferies et al., 2000). Sin embargo no se han encontrado genes que puedan codificar una transportador de membrana en esta zona (Schnurbusch et al., 2007). Las diferencias de tolerancia encontradas en los genotipos de cebada se deben al distinto grado de expresión que presenta el gen, a mayor expresión mayor tolerancia (Reid, 2007). La acumulación de transcritos del gen *Bot1*, un ortólogo del *BOR1* en cebada, se ha identificado como causa de la tolerancia a boro. El cultivar Sahara 3771 presentaba 3.8 veces más copias y alrededor de 160 veces más transcritos en raíz, y 18 en hojas, que el cultivar sensible Clipper. Además, en levaduras, la copia de Sahara proporciona mejor capacidad de tolerancia que la copia de Clipper o el *BOR1* de *Arabidopsis* (Sutton et al., 2007). También se ha sugerido que el gen *BOR2* codifica para un transportador de borato responsable de tolerancia en trigo y cebada (Reid, 2007).

Existen varios estudios sobre la introgresión del gen de tolerancia de cebada del cromosoma 4H. Sin embargo, en muchos de estos trabajos no se ha obtenido un aumento de rendimiento en los cultivares introgresados (McDonald et al., 2009). No se conoce todavía si esto es debido al ligamiento de genes deletéreos de Sahara3771 (Eglinton et al., 2004) o a una repuesta compleja en la interacción genotipo-ambiente (Nuttall et al., 2005; Emebiri et al., 2009). Lo que sí parece claro es que la introgresión de solamente el loci 4H de Sahara 3771 no presenta beneficios en cuanto a rendimiento (Schnurbusch et al., 2008; McDonald et al., 2009).

1.3.8 Métodos de determinación de toxicidad en plantas y selección *in vitro*.

El rendimiento de los cultivos está sujeto a la interacción con el ambiente. Los principales estreses abióticos que reducen la productividad son la salinidad, la sequía, el encharcamiento, el calor, las heladas y las toxicidades minerales. Para afrontar las

limitaciones que producen los estreses abióticos desde un punto de vista biotecnológico se hace necesario el conocimiento biológico de las especies y los mecanismos de resistencia y tolerancia disponibles. El desarrollo de plantas tolerantes a muchos de estos estreses abióticos se ha conseguido mediante el empleo de selección *in vitro*, incluyendo un amplio rango de especies como cereales, hortalizas, frutas y ornamentales (Remotti, 1998; Jain, 2001; Rai et al., 2011).

La selección *in vitro* minimiza la influencia del ambiente pudiendo complementar el trabajo de selección en campo, que requiere una gran cantidad de espacio y tiempo (Jain, 2001). La selección *in vitro* también permite evaluar una mayor cantidad de individuos y, si se apoya en material DH, se puede facilitar el estudio genético del carácter de interés. La técnica de producción de DH debe ser suficientemente eficiente para obtener un buen número de DH. Con los DH puede realizarse un cribado de: genotipos diferentes, de líneas mutadas artificialmente y de DH procedentes de un cruce F1. Así también es posible obtener combinaciones alélicas menos frecuentes que pueden tener un interés en programas de mejora (Deveaux and Pickering, 2005) y en caso de existencia de “linkage drag” se hace posible la discriminación para eventos de recombinación específicos (Eglinton et al., 2004).

De manera general existen dos modelos de selección *in vitro*:

- Selección directa. Se realiza con una concentración letal o subletal de agente selectivo.

- Selección por pasos. Se lleva a cabo incrementando progresivamente la cantidad de agente selectivo desde concentraciones subletales hasta finalmente alcanzar la letal. En este caso, la aplicación de la presión de selección se puede realizar de manera continua o discontinua, es decir, se pueden ir alternando periodos de cultivo en medio no selectivo. Estos descansos permiten una recuperación parcial de las líneas seleccionadas e incrementa el número de plantas regeneradas, siendo especialmente útil en germoplasma recalcitrante o de baja regenerabilidad.

Una vez efectuada la selección las plantas/líneas seleccionadas deben ser testadas para evaluar la estabilidad del carácter. Las condiciones de cultivo pueden inducir cambios en las plantas regeneradas, a lo que se denomina variación somaclonal. La variación somaclonal puede resultar en cambios genéticos estables útiles para la mejora vegetal, de hecho, se ha propuesto como una fuente de variabilidad importante en la mejora para tolerancia a diversos estreses abióticos (Larkin and Scowcroft, 1981). Hay que tener en cuenta que la variación somaclonal puede inducir tanto nuevas propiedades como alteraciones indeseables (Bregitzer and Poulson, 1995). En muchos casos se producen habituaciones al medio de selección que no constituyen verdaderos cambios en el material genético. Estas adaptaciones son cambios epigenéticos que se suelen revertir al fenotipo salvaje cuando se deja de aplicar la presión de selección, o después de la regeneración, y están incluidas en el conjunto de variación somaclonal. Varios estudios documentan que la alteración de la metilación del ADN es una de las causas principales de las modificaciones epigenéticas que son observadas en los cultivos *in vitro* (Guo et al., 2007; Li et al., 2007). Se sugirió que para evitar el problema de la aparición de adaptaciones epigenéticas no heredables se utilizaran modelos de selección de un solo paso con periodos de cultivo cortos y rehuyendo la utilización de callos como material vegetal (Chandler and Thorpe, 1986; Dix, 1990; Tal, 1994).

Se suele aconsejar que los chequeos posteriores para caracterizar la línea para un determinado carácter se realicen a partir de la tercera generación (Chaleff and Keil, 1981). Las plantas directamente regeneradas de las células o explantos se denominan R1. Si se han seleccionado plantas con caracteres que difieren de aquellos de los

parentales, es decir, se han seleccionado somaclones, se denominaría S1. Las sucesivas generaciones serían S2, S3, etc (Remotti, 1998).

Teniendo en cuenta que se han conseguido buenos resultados con selección *in vitro* para tolerancia a salinidad en tabaco (Sumaryati et al., 1992), sorgo (Duncan et al., 1995), trigo (Zair et al., 2003), tomate y *Vigna radiata* (Hassan et al., 2008), arroz (Binh et al., 1992; Zhu et al., 2000; Lee et al., 2003), entre otros, resulta cuando menos curioso que no se hayan estudiado métodos de selección *in vitro* para tolerancia a la toxicidad por boro. Estos resultados han sugerido que la selección *in vitro* para tolerancia a este elemento puede ser un buen punto de partida para los programas de mejora.

Los métodos más utilizados para determinar la tolerancia o sensibilidad de un cultivo hacia la toxicidad de boro son los cultivos hidropónicos (Chantachume et al., 1995; Kaur et al., 2006) y los experimentos llevados a cabo en invernadero con suelo contaminado o mediante la adición de boro en el agua de riego.

Muy pocos estudios se han dedicado a la selección de material mediante el uso de suspensiones celulares, lo que pudo ser debido a la necesidad de disponer de un laboratorio de cultivo *in vitro* o que simplemente no se sopesó su uso. Jenkin et al. (1993) usaron protoplastos (células sin pared celular) derivados de tejido foliar para cuantificar la absorción de ^{10}B . No encontraron diferencias entre el genotipo tolerante y sensible por lo que determinan que la PC está envuelta en la regulación de absorción de boro.

1.4 ESTRÉS BIÓTICO: LA FUSARIOSIS DE LA ESPIGA

1.4.1 Generalidades y taxonomía de *Fusarium*

Entre los hongos patógenos con mayor incidencia en el rendimiento de los cultivos están aquellos que pertenecen al género *Fusarium*, parásitos facultativos que forman parte de la microbiota normal del suelo. Son capaces de infectar un amplio rango de huéspedes: hortalizas, leguminosas, leñosas, bulbos, tubérculos, ornamentales y cereales. Su ubicuidad y su capacidad de sobrevivir de manera saprofítica sobre material vegetal en descomposición hacen de estos hongos uno de los problemas más difíciles de solucionar en la producción de cereales a nivel mundial.

En España se ha reportado la existencia de diversas especies de *Fusarium* causantes de varias enfermedades en cereales (Tabla 1.4).

La cebada y el trigo constituyen prácticamente las dos terceras partes de la producción de cereales a nivel mundial. Las infecciones fúngicas en estos cultivos llevan consigo importantes consecuencias socio-económicas y sanitarias por la incorporación de micotoxinas a la cadena alimenticia (Pestka and Smolinski, 2005).

El género *Fusarium* es el responsable de la fusariosis de la espiga en cereales, una epidemia a nivel mundial (Placinta et al., 1999). En Europa provoca entre un 10% y un 40% de pérdidas en la producción de estos dos cereales.

La Fusariosis de la espiga es comúnmente llamada FHB por sus siglas en inglés: *Fusarium* Head Blight, aunque también recibe los nombres de *Fusarium* Ear Blight, Scab, Añublo y Golpe blanco.

En general, en las distintas regiones afectadas por la FHB existen diferentes patrones de especie cuya predominancia está influenciada por las condiciones climáticas (pluviometría y temperatura en la etapa de floración), el genotipo hospedante, y otros parámetros de carácter agronómico. El principal causante de FHB en cereales en todo el mundo es *F. graminearum* Schw. En Europa, las principales especies asociadas a la

enfermedad tanto para cebada como para otros cereales de grano pequeño son *F. graminearum*, *F. avenaceum* y *F. culmorum* (Mesterhazy, 1987; Miedaner et al., 2001; Mesterhazy, 2002), en los que el deoxinivalenol (DON) y sus derivados son las micotoxinas más frecuentes (Bottalico and Perrone, 2002).

Tabla 1.4 Especies de patógenos causantes de fusariosis en cereales en España. Datos recopilados de (MAPA, 2010)

Especie	Huésped	Enfermedad
<i>F. poae</i>	Trigo	“Espigas fallidas”
<i>F. senitectum</i>	Arroz y maíz	Podredumbre de raíz y tallo
<i>F. avenaceum</i>	Trigo	Podredumbre de raíz y tallo
<i>F. moniliforme</i> (= <i>F. verticillioides</i>)	Arroz, caña de azúcar y maíz	Anamorfo= Podredumbre de raíz y pie Teleomorfo= bakanae del arroz
<i>F. equiseti</i>	Arroz y maíz	Podredumbre de raíz y tallo
<i>F. tricinctum</i>	Gramíneas	Podredumbre de raíz y tallo
<i>F. graminearum</i>	Arroz, cebada, maíz, trigo.	Podredumbre pie, posible extensión al resto de la planta y cuerpos fructíferos.
<i>Monographella nivalis</i>	Avena, cebada, centeno, trigo	Muerte de las plántulas
<i>F. culmorum</i>	Arroz, maíz, cebada y trigo	Podredumbre de tallo y cuello, en algunas ocasiones puede afectar a la espiga.
<i>F. subglutinans</i>	Maíz	Frena el crecimiento.

El nombre de *Fusarium* fue acuñado en 1809 por el micólogo alemán Link, denominando así a un conjunto de hongos con esporas fusiformes. La primera referencia sobre FHB la realizó Smith en 1884, en Inglaterra, definiendo el agente etiológico como *Fusisporium culmorum*. En EEUU también se llevaron a cabo identificaciones de la enfermedad en trigo en Ohio (Chester, 1890; Arthur, 1891).

Con una historia sistemática complicada, los hongos del género *Fusarium* se enmarca dentro de los anamorfos ascomicetes hipocreales, considerándose sus teleomorfos dentro de los géneros *Gibberella* y *Nectria* (algunas especies tienen un estado sexual reconocido dentro del género *Gibberella* o *Nectria*). Son saprófitos y parásitos facultativos. El género *Fusarium* comprende 16 secciones diferentes, de las cuales cuatro incluyen los patógenos relacionados con la FHB:

- Sección Discolor: especies *F. graminearum* (*Giberella zeae*), *F. culmorum*, *F. crookwellense*.
- Sección Gibbosum: *F. equiseti*, *F. scirpi*, *F. acuminatum* (*Giberella acuminata*).
- Sección Roseum: *F. avenaceum* (*Giberella Avenacea*.)
- Sección Sporotrichiella: *F. Poae*, *F. tricinctum*, *F. sporotrichioides*.

Hay que hacer especial mención a *Michrodochium nivale* (Schaffnit) Muller (teleomorfo= *Monographaella nivalis*). Anteriormente era conocido como *F. nivale* y actualmente se engloba dentro de los hiponectriaceales. Este hongo también es causante de FHB y presenta una producción de toxinas como diacetilnivalenol, nivalenol, zearalenona y toxina T-2 (Liddell, 2004).

En 1935 Wollenweber y Reinking editaron “Die Fusarien”, publicación que sentó las base de la sistemática actual del género *Fusarium* mediante la especial atención a los caracteres morfométricos. Actualmente el sistema de clasificación se decanta por una integración de estos valores junto con la filogenética molecular (Liddell, 1991).

Se suelen subdividir en dos grupos: el Grupo1 corresponde a aquellos que no forman peritecios *in vitro* y que raramente lo hacen *in vivo*. Desarrollan las podredumbres; y el Grupo2 los que forman peritecios y están relacionados con las enfermedades de partes aéreas.

Tabla 1.5. Taxonomía de *Fusarium*.

División	<i>Ascomycota</i>
Clase	<i>Euscomycetes</i>
Orden	<i>Hypocreales</i>
Familia	<i>Hypocreaceae</i>
Género	<i>Fusarium</i>

Existen numerosos manuales y claves de identificación de especies de *Fusarium*, inclusive interactivas como la FUSKEY (Seifert and Cereal, 1996). Las características primarias de identificación, aunque no de diferenciación, son los rasgos macroscópicos observables en diferentes medios de cultivo como la morfología y la pigmentación de la colonia, la ausencia o presencia de esporodoquia, esclerotia o estroma (Monzón A. and L., 1999).

Los métodos para la cuantificación y detección de *F. graminearum* en plantas incluyen la medición de ergosterol (Miller et al., 1985) y los ensayos basados en la PCR (Schilling et al., 1996; Nicholson et al., 1998). El gen GUS también ha sido útil en la cuantificación de la dispersión y crecimiento de diferentes patógenos como *Cladosporium fulvum*, *Leptosphaeria maculans*, *Pseudocercospora herpotrichoides*, *F. oxysporum*, *F. culmorum* y *F. moniliforme* (Pritsch et al., 2001).

1.4.2 Desarrollo, evolución de la enfermedad y síntomas.

La fusariosis es una enfermedad monocíclica en las que los inóculos iniciales son las macroconidias, ascosporas fragmentos de hifas y clamidosporas, siendo los dos primeros los más comunes. De todas maneras en la severidad final también influyen las inoculaciones e infecciones que se producen durante todo el periodo de floración. Esta co-ocurrencia de especies de *Fusarium* se suele denominar “complejo”, pudiéndose asilar hasta 19 especies diferentes en una única muestra de tejido infectado.

En un primer momento, y debido a que también producen las “foot rot diseases” (que incluyen “Crown rot disease” y “root rot”), se consideró una enfermedad sistémica. Actualmente se ha descartado esta valoración ya que en suelos contaminados con *F. graminearum* únicamente se llegaron a colonizar el 10 al 20% de los tres primeros internodos sin llegar a crecer en partes superiores, sin presentar estas plantas diferencias significativas respecto a las control (Bushnell et al., 2004).

1.4.2.1. CICLO DE INFECCIÓN

- El inóculo:

El principal inóculo proviene de los rastrojos de plantas infectadas donde el hongo sobrevive como un micelio saprofítico. Bajo condiciones adecuadas de humedad y temperatura se desarrollan y maduran los conidios y peritecios que producirán las ascosporas en el momento de la floración del cereal (Markell and Francel, 2003). Las ascosporas se expulsan al exterior del cuerpo fructífero y se dispersan con la ayuda del viento, lluvia, riego o insectos hacia la planta anfitriona (Parry et al., 1995).

- Colonización del exterior:

Ni *Fusarium graminearum* ni *F. culmorum* pueden penetrar directamente la pared epidérmica de la superficie de glumas, lemma y paleas. Las hifas del hongo se desarrollan en las superficies exteriores de la flor en espera y búsqueda de un sitio de penetración (Bushnell et al. 2003). Este es el primer paso de la infección. En condiciones normales de campo se crea una capa fina micelial después de la germinación de los macroconidias. *In vitro* esto se puede dar a las 5-6 horas de la aparición de los tubos de germinación. Estas hifas explorarán toda la superficie de la flor buscando lugares de entrada, como estomas o zonas dañadas.

- La entrada en la flor:

Una vez colonizado el exterior se puede producir un crecimiento subcuticular. Es también un estadio inicial de la infección y con ello se proporciona un nicho ideal para el hongo ya que se encuentra protegido de la desecación que podría acaecer en el exterior. Este sistema se ha descrito en otros patógenos como *Rhynchosporium secalis* en cebada (Ayres and Owen, 1971) o *Pyricularia oryza* en arroz (Koga, 1995). Así mismo, se puede considerar como mecanismo de expansión de la enfermedad y como método de penetración hacia las células epidérmicas.

Para conseguir entrar en el parénquima el hongo dispone de diferentes pasos:

- Acceso a través de heridas.
- Llegada a través de los estomas. Pritsch et al. (2000) mostraron bajo microscopia de fluorescencia que la infección del parénquima de las glumas proviene de la penetración de las hifas de *F. graminearum* a través de los estomas, y Ribichich et al. (2000) determinan en trigo que la infección del clorénquima de glumas, lemma y palea se colapsaba y necrosaba en las espigas infectadas.
- Por las anteras. Existe una correlación positiva entre la excreción parcial de las anteras y el nivel de infección. Se ha considerado que las anteras pueden contener sustancias que estimulen el crecimiento fúngico, como la betaína y la colina, o que aumenten su germinación como los dializados de polen (Kang and Buchenauer, 2000).
- Aperturas entre palea y lemma: en el momento de la dehiscencia la palea y la lemma se separan un poco, lo que da una oportunidad a las esporas a entrar transportadas mediante el viento, por gotas de lluvia o insectos y ácaros. Este tipo de entrada es típica en otras enfermedades como el ergot en centeno y triticale, especies de polinización cruzada.
- Ingreso a través de la base de las glumas en trigo. Esta zona presenta una pared más estrecha que el resto.
- Mediante la producción de enzimas degradadoras de pared: celulasas, pectinasas y xilanasas (Schwarz et al., 2002).

Una vez ha entrado el hongo, el éxito en la infección de tejidos interiores de la flor está bastante asegurado. Las partes que sufren mayor colonización son las anteras, estigmas y lodículos (Goswami, 2004).

- Ataque a la cariopsis:

Si la colonización descrita en los párrafos anteriores se produce antes de 10 días desde la polinización, no existe ninguna barrera para el acceso del hongo al ovario y al endospermo, ya que hasta ese momento no comienza el engrosamiento y diferenciación de las partes que componen la cariopsis. En algunos genotipos de trigo muy sensibles, la

invasión del embrión se puede observar incluso en flores infectadas de dos a tres semanas después de la antesis. En cariopsis infectadas después de alcanzada la madurez no se produce la irrupción del hongo en el embrión pero sí en la nucela. En cebada no existe mucha información respecto al desarrollo de la enfermedad (Bushnell et al., 2004).

Con la invasión del endospermo se genera una digestión de proteínas y almidón. En trigo se ha descrito la reducción en el contenido de almidón, celulosa, hemicelulosa y contenido en proteína.

- Propagación flor a flor:

La dispersión del hongo espiguilla a espiguilla se origina a través de los haces vasculares del raquis y raquilla (Ribichich et al., 2000) o en condiciones de alta humedad ambiental mediante la dispersión exterior de glumas, lemma y pálea (Bushnell et al., 2003).

La propagación interna de la infección es el modo de dispersión más eficaz (Kang and Buchenauer, 2000; Kang and Buchenauer, 2000). Se realiza mediante la colonización de los haces vasculares, siendo más intensa la del floema. Como consecuencia de la entrada de las hifas se ha advertido el engrosamiento de las paredes, deposición de aposiciones en la pared y oclusión de los haces (Kang et al., 2005), con lo que finalmente se podría producir el colapso del floema y la disfunción de xilema, provocando la muerte de las espiguillas en puntos superiores a la infección.

- Paso de biotrófico a necrotrófico

F. graminearum demuestra un comportamiento biotrófico en los primeros estadios de colonización de tejidos o incluso se presenta una infección asintomática en algunas partes de la planta. Una vez ha colonizado las células de mesófilo y epidermis se producen síntomas de clorosis lo que indica el comienzo de interacción necrotrófica (Bushnell et al., 2004).

Para una mayor revisión: “*Fusarium* Head Blight of Wheat and Barley” (Champeil et al., 2004; Leonard and Bushnell, 2004).

1.4.2.2. SÍNTOMAS

La primera referencia que describe ampliamente los síntomas de la fusariosis corresponde a Atanasoff en 1920, aunque ya anteriormente se había expuesto el cuadro sintomatológico en varios artículos concretando como principal característica la formación de una masa de esporas rosa, y si el ambiente era lo suficientemente favorable, la formación de peritecios en las espigas.

La descripción de los síntomas está estrechamente ligada al proceso de evolución de la enfermedad, si bien se consideran una serie de daños generales al final del proceso infeccioso que se usan como método de fenotipado.

Los síntomas son parecidos en todos los cereales (Figura 1.3). Los primeros signos aparecen en las primeras flores en abrirse, generalmente las del medio de la espiga, desarrollándose síntomas visibles en dos a cuatro días si las condiciones para la infección son las óptimas. Las lesiones suelen ser pequeñas manchas marrones que parecen mojadas por gotas de agua en el raquis o en la gluma. Posteriormente se extienden y aparecen decoloraciones y zonas cloróticas. Más tarde crece una masa

fúngica de color salmón a rojo en el borde de las glumas o en la base de las espiguillas, los granos se arrugan y se tornan grises o marrones con un interior claro.

A medida que la infección progresa, la decoloración de las flores se extiende apical y basalmente desde la flor infectada. El blanqueamiento, tanto de hojas como de espigas, es causado por el DON (Bushnell et al., 2010).

En climas muy húmedos y templados también se puede producir la aparición temprana de la enfermedad, detectándose por el moteado y desarrollo de peritecios azul negruzcos (de aquí vino el nombre de scab=costra) (Parry et al., 1995).

Respecto a los efectos en el rendimiento en grano se destaca la aparición de los “Tombstone kernels”. Son los granos que, debido a la infección con *Fusarium* son más pequeños de lo normal, parecen arrugados o marchitados, y de color blanquecino a rosa pálido. Obviamente, en la disminución del rendimiento también influye la esterilidad de la flor, o su muerte, en casos de alta severidad de FHB.

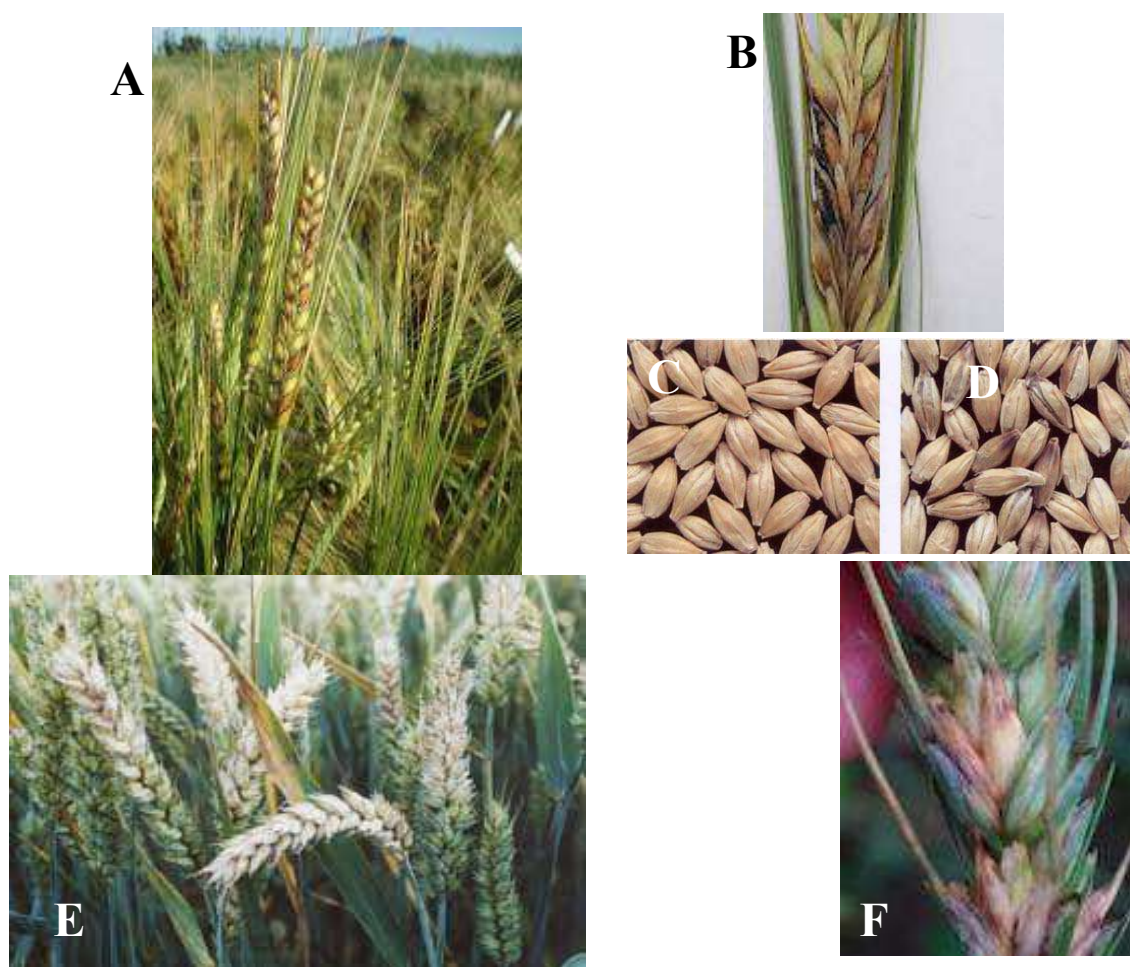


Figura 1.3. Algunos de los síntomas y efectos del FHB. A/cebada afectada por FHB y B/detalle. C y D/ granos de cebada sanos y afectados, respectivamente. E/ blanqueamiento de espigas de trigo, F/ micelio rosa de *Fusarium* en trigo.

La fusariosis de la espiga no solo es importante por la disminución de la germinación y del rendimiento del grano debida a la reducción en el número de granos por espiga y el peso de éste. También influye en la elaboración de cerveza a causa de la producción de micotoxinas produciendo el aumento de los niveles de nitrógeno total en el mosto y aminoácidos libres en la malta, así como pudiendo llegar a provocar aromas indeseados y el malogrado de la cerveza. Asimismo hay que prestar especial atención al contenido de micotoxinas en la elaboración de piensos ya que se han descrito

numerosos síntomas de toxicosis (Morgavi and Riley, 2007). En la Tabla 1.6 aparecen resumidos los principales efectos descritos en animales y humanos de diferentes micotoxinas.

Tabla 1.6 Toxinas de *Fusarium*, cultivos en que aparece y efectos en la salud animal y humana. (Wu, 2007)

Micotoxina	Cultivo	Efecto en la salud animal
Fumonisin	Maiz, arroz, sorgo	Leucoencefalomalacia equina, edema pulmonar porcino, cáncer hepático y renal en roedores
DON	Maiz, trigo, cebada	Vómitos, náuseas, rechazo al alimento, inmunosupresión, problemas reproductivos
Zearalenona	Maiz, trigo, cebada	Estrogenismo y vulvovaginitis en cerdos
Toxina T-2	Maiz, trigo, cebada, arroz, soja	Inmunosupresión y pérdidas productivas
Nivalenol	Maiz, trigo, cebada	Inmunosupresión y pérdidas productivas
Diacetoxycirpenol	Maiz, trigo, cebada, arroz, soja	Inmunosupresión y pérdidas productivas
Fusaproliferina	Maiz	Rechazo al alimento y efectos teratogénicos en caballos

La utilización de *Fusarium* como elemento en la guerra bacteriológica tuvo su origen en la observación de las grandes mortandades que se produjeron en la Unión Soviética décadas de 1930 y 1940 cuando *Fusarium* contaminó la harina de trigo que se usó para elaborar pan y causó una intoxicación alimentaria con una tasa de mortalidad del 60%. El cuadro sintomatológico era muy amplio incluyendo dolor abdominal, diarrea, vómitos, fiebre, mialgias, depresión de la médula ósea con granulocitopenia e infecciones secundarias, ulceraciones. La contaminación por *Fusarium sporotrichoides* se encontró en los cereales afectados en 1932. Estos hechos estimularon las investigaciones con fines médicos aunque también para un posible uso en la guerra biológica. El ingrediente activo que se encontró fueron los tricotecenos, y entre ellos, el DON o vomitoxina. Se cree que fue producido en cantidad e incluido en armamento antes de la entrada en vigor de la Convención de Armas Biológicas de 1972. Los soviéticos fueron acusados por EEUU de utilizar este agente bajo el nombre de "Lluvia amarilla", y que se presume causó 6.300 muertes en Laos (1975), Camboya (1979) y Afganistán (1979) (Hernandez-Chavarria, 2002)

La comisión europea establece guías de los límites de micotoxinas de *Fusarium* en alimentos animales y humanos (Tabla 1.7). Esta legislación (Comisión Regulación EC, 2006) se revisa periódicamente y sale publicada en la Revista Oficial de la Unión Europea. La forma en que se determinan estos niveles aparece recogida en el trabajo de Pieters et al. (2002).

Tabla 1.7 Límites establecidos para DON y zearelon en ppb en productos de consumo de humano basados en la regulación de la comisión europea (EC) 1881/2006.

Producto	Micotoxina (ppb)	
	DON	Zearelon
Cereales no procesados diferentes de trigo, avena y maíz	1250	100
Trigo duro y avena no procesado	1750	10
Maíz no procesado	1750	200
Harina de cereales	750	75
Harina de maíz	750	200
Pan, pastas, galletas, snacks y cereales de desayuno	500	50
Alimentos basados en cereales procesados para niños y bebés	200	20

1.4.3 Micotoxinas

Las micotoxicosis no se definieron hasta 1960, momento del descubrimiento de la aflatoxina en Gran Bretaña. En esta época se produjeron una serie de pérdidas importantes en el número de cabezas de ganado debidas a una enfermedad de etiología desconocida. Estaba causando estragos sobre todo en la cría de pavos, por lo que se denominó “Enfermedad X de los pavos”. Investigaciones que asociaban la presencia-ausencia de un determinado hongo en el alimento con la aparición de los síntomas de la enfermedad dieron lugar al hallazgo del ente patógeno, *Aspergillus flavus*, y al posterior aislamiento de la toxina (Requena et al., 2005). A partir de entonces empezaron a aislarse otras muchas micotoxinas, entre ellas las del género *Fusarium*, cuya importancia no ha parado de crecer desde su descubrimiento.

Son conocidas muchas especies de hongos micotoxigénicos como *Fusarium*, *Alternaria*, *Aspergillus* y *Penicillium*. Entre las toxinas que producen están las aflatoxinas, ocratoxinas, fumonisinas, tricotecenos, zearalenona, patulina, alternariatoxina, moniliformina, fusaproliferina y beauvericina.

Las diferentes razas de *Fusarium* pueden producir diferentes mezclas de metabolitos que pueden ser micotoxinas, sustancias antifúngicas e insecticidas. Se consideran tres clases principales de toxinas en el género *Fusarium*, las fumonisinas, los tricotecenos y zearelonas; y toxinas secundarias: bauvericina, fusaproliferina, fusarinas y moniliformina. En la Tabla 1.8 se aporta un listado de especies de *Fusarium* y las toxinas que producen.

Tabla 1.8 Especies toxigénicas de *Fusarium* asociadas a cereales y sus micotoxinas. Extraído de Logrieco et al., 2003.

Espece de <i>Fusarium</i> ^a	Micotoxina ^b
<i>F. acuminatum</i>	T2 , MON , HT2 , DAS , MAS , NEO , BEA
<i>F. anthophilum</i>	BEA
<i>F. avenaceum</i>	MON , EN , BEA
<i>F. cerealis</i> (<i>F. crookwellense</i>)	NIV , FUS , ZEA , ZOH
<i>F. chlamydosporum</i>	MON
<i>F. culmorum</i>	DON , ZEA , NIV , FUS , ZOH , AcDON
<i>F. equiseti</i>	ZEA , ZOH , MAS , DAS , NIV , DAcNIV , FUS , FUC , BEA
<i>F. graminearum</i>	DON , ZEA , NIV , FUS , AcDON , DAcDON , DAcNIV
<i>F. heterosporum</i>	ZEA , ZOH
<i>F. nygamai</i>	FB₁ , BEA , FB₂
<i>F. oxysporum</i>	MON , EN , BEA
<i>F. poae</i>	DAS , NIV , FUS , MAS , T2 , HT2 , NEO , BEA
<i>F. proliferatum</i>	FB₁ , BEA , MON , FUP , FB₂
<i>F. sambucinum</i>	DAS , T2 , NEO , MAS , BEA
<i>F. semitectum</i>	BEA
<i>F. sporotrichioides</i>	T2 , HT2 , NEO , MAS , DAS
<i>F. subglutinans</i>	BEA , MON , FUP
<i>F. tricinctum</i>	MON , BEA
<i>F. verticillioides</i> (<i>F. moniliforme</i>)	FB₁ , FB₂ , FB₃

^aAcDON = mono-acetyldeoxynivalenols (3-AcDON, 15-AcDON); AcNIV = mono-acetyl nivalenol (15-AcNIV); BEA = beauvericin; DiAcDON = di-acetyldeoxynivalenol (3,15-AcDON); DAcNIV = diacetyl nivalenol (4,15-AcNIV); DAS = diacetoxyscirpenol; DON = deoxynivalenol (Vomitoxin); EN = enniatins; FB₁ = fumonisin B₁; FB₂ = fumonisin B₂; FB₃ = fumonisin B₃; FUP = fusaproliferin; FUS = fusarenone-X (=4-Acetyl-NIV); FUC = fusarochromanone; HT2 = HT-2 toxin; MAS = monoacetoxyscirpenol; MON = moniliformin; NEO = neosolaniol; NIV = nivalenol; T2 = T-2 toxin; ZEA = zearalenone; ZOH = zearalenols (α and β isomers).

^bBold letters indicate the main mycotoxin produced.

Las especies más agresivas en cereales de grano pequeño en Europa son *F. graminearum*, *F. avenaceum* and *F. culmorum*. Existen especies menos agresivas como son *F. sporotrichioides* y *F. poae*, pero ello no implica que no se les deba prestar atención puesto que son capaces de producir compuestos tóxicos bastante perjudiciales (Miedaner, 1997). En la Tabla 1.7 vemos la distribución en Europa de las principales especies de *Fusarium* asociadas a sus toxinas. Para mayor revisión los diferentes complejos de *Fusarium* en diferentes países, zonas de Europa, las toxinas que presentan y sus efectos Bottalico and Perrone (2002) y Desjardins (2006). En España se ha detectado recientemente en regiones septentrionales la presencia de tricotecenos de clase A y B en cebada (Ibañez-Vea et al., 2011).

1.4.3.1. TRICOTRECENOS.

La producción de tricotecenos es característica de hongos ascomicetos, aunque no todas sus especies puedan producirlos, y de los hifomicetes y coelomicetes asociados a los estados sexuales de los primeros. De todas las micotoxinas producidas por *Fusarium*, los tricotecenos son los más asociados con toxicosis crónicas y serias. Se conocen unos 180 tricotecenos pero solo unos pocos tienen relevancia para la salud animal y humana. Dentro de este grupo de toxinas destaca el DON como agente contaminante en alimentos. El 3-AcDON, la toxina T-2, y nivalenol también aparecen de forma habitual.

El primer método de detección y cuantificación de tricotecenos fue la cromatografía de capa fina. Iluminando las fases de esta cromatografía con luz ultravioleta se diferenciaron los tricotecenos del grupo A, que presentaban coloración azul, y los del grupo B, con reacción de color marrón. Los tricotecenos del grupo B son el nivalenol y el DON, que presentan un grupo ceto en posición C8, los del grupo A, diacetoxiscirpenol, scirpentriol y toxina T-2, no lo presentan. También existen los grupos C y D de tricotecenos que pertenecen a otros hongos no *Fusarium*. Contienen un grupo epóxido extra y un anillo entre el carbono 4 y el 15 con ligamientos éster, respectivamente (Schollenberger et al., 2007).

Actualmente existen muchos métodos de detección de tricotecenos (Scudamore and Livesey, 1998; Mirocha et al., 2003; Bartok et al., 2006) como la cromatografía líquida de alta resolución, cromatografía de gas acoplada a espectrometría de masas, e inclusive la detección de especies de *Fusarium* mediante reacciones con anticuerpos y técnicas de PCR (Nicholson et al., 1998; Hill et al., 2006).

Las síntesis de todos los tricotecenos procede de la transformación del farnesilpirofosfato en tricodieno por la sesquiterpeno ciclase (*TRI5*). Posteriormente se producen una serie de reacciones de oxigenación, isomerización, ciclación y esterificaciones que darán lugar a los diferentes intermediarios y toxinas. No entraré en detalle en las reacciones y regulación de la ruta. Para consultar las particularidades de la formación de tricotecenos se pueden revisar Desjardins et al. (1993; 1995; 2006) y Kimura et al. (2007).

Como he comentado arriba los tricotecenos son potentes fitotoxinas, que a muy bajas concentraciones (10^{-5} - 10^{-6} M) pueden producir una amplia gama de síntomas como marchitamientos, clorosis, necrosis (Desjardins et al., 1995). También influyen en el paso de interacción biotrófica a necrótica del hongo en la planta huésped. Según esto, algunos autores propusieron los tricotecenos como factores de patogénesis. En la inoculación de trigo, maíz centeno, avena y cebada se utilizaron razas modificadas de *Fusarium graminearum* con un gen mutante, *TRI5⁻*, por tanto no productoras de tricotecenos, y razas silvestres productoras. Las *TRI5⁻* eran capaces de infectar aunque

de una manera muy reducida respecto a las silvestres, es decir, se disminuía claramente la incidencia de la enfermedad (Desjardins et al., 1993). Era posible revertir este efecto restaurando la capacidad de producción de tricotecenos de estos hongos mediante reversión génica y complementariedad de mutación (Proctor et al., 1995), con lo que se determinó que los tricotecenos sí son factores de virulencia (Proctor et al., 1997).

La siguiente pregunta lógica que surgió después de este descubrimiento fue: ¿son todos los tricotecenos factores de virulencia?

Ha existido una controversia sobre si existía un verdadero rol del DON en la patogénesis. Según algún autor no se correlaciona la cantidad de toxina con la severidad de la enfermedad (Eudes et al., 1997; Mesterhazy, 2002) aunque en otros casos se dice lo contrario (Snijders and Perkowski, 1990). También se expone que la detoxificación de tricotecenos no previene la infección de las cariósides a través de las anteras, el hueco entre lemma y palea, y el epicarpo, tanto en trigo como en cebada. La infección del epicarpo produce una rápida muerte celular de las diferentes capas de manera independiente a la producción de tricotecenos (Miedaner et al., 2003; Snijders, 2004).

Por otro lado, Eudes et al. (1997) reportaron que el DON y el 3-AcDON son mucho más tóxicos para las plantas que la toxina T-2 o el nivalenol. Shimada y Otani (Jansen et al., 2005) encontraron que el NIV era considerablemente menos fitotóxico que el DON, al igual que lo hicieron Miedaner et al. (1990) y Muthomi et al. (2001). Mesterhazy (2000) describe una influencia compleja del DON y otros tricotecenos en la evolución de la enfermedad, con lo que jugarían un papel importante en la agresividad de *F. graminearum* y *F. culmorum*. La cantidad de toxina producida es proporcional a la agresividad para aquellos patotipos productores de DON (2002). Por tanto el DON era uno de los principales candidatos a tener en cuenta como catalizador del estadio necrotrófico.

Se realizaron ensayos para determinar el momento de producción durante el desarrollo de la infección. Se encontró que el DON y el 15-AcDON se producían a las 36-48h después de la inoculación de macroconidias en las flores de cebada. Una vez consolidada la infección del hongo, el DON se puede encontrar en tejidos no colonizados por el micelio, lo que indicó su capacidad de difusión. El DON es soluble en agua y se ha demostrado que actúa de avanzadilla de las hifas del hongo (Gang et al., 1998; Hestbjerg, 2002; Mesterhazy et al., 2005). Interfiere directamente en la formación de proteínas mediante su intervención en la peptidil transferasa localizada en la subunidad ribosómica 60S, desencadenando una serie de efectos secundarios como la inhibición de síntesis de DNA y división celular (Snijders, 1994). La inhibición de la actividad enzimática en huéspedes susceptibles daría lugar a un rápido repunte de la enfermedad. Este teoría ha sido apoyada por Muthomi et al. (2000), que reportan una alta correlación entre agresividad y producción de DON en *F. culmorum*. Con todos estos datos, diferentes equipos de investigación determinaron que el DON no interviene en el proceso inicial biotrófico y sólo juega un papel en la fase necrotrófica (Kang and Buchenauer, 1999), lo que también le confiere estatus de factor de virulencia (Bushnell et al., 2004).

1.4.4 Control FHB

En muchos casos los niveles aceptados para consumo humano no son lo suficientemente bajos para poder realizar un correcto procesado de las harinas y maltas, como puede ser el caso del “gushing” de la cerveza, del levedado en harinas y producción de copos de trigo y maíz. Además con el procesado se producen una serie de

subproductos que deben ser evaluados para estimar sus riesgos para la salud (Walker, 2008).

Para asegurar un producto final sin contaminantes es importante prestar atención a todos los puntos de desarrollo del cultivo incluyendo el historial de cultivo del campo que empleamos, las prácticas agronómicas que realizamos y la manipulación final de la cosecha. A continuación se exponen los factores que más se tienen en cuenta:

1.4.4.1. FACTORES DE RIESGO ANTES DE COSECHA

- Región

Cada región tiene unas características específicas de climatología, edafología, de cultivos sembrados y prácticas agronómicas (McCormick et al., 2003). La medida de riesgo está basada en la media de incidencia de FHB en un periodo largo, el máximo disponible y normalmente mayor de 10 años

- Naturaleza de la FHB:

Cada especie de *Fusarium* presenta un sistema de infección determinado. Dependiendo de la zona existirán diferentes complejos de *Fusarium* que producirán diferentes tipos de toxina y por tanto exigirán un manejo diferente.

- Variedad que se cultiva.

Siempre se desea combinar en una misma variedad alto grado de resistencia a estrés y gran rendimiento. Sin embargo esto no siempre es posible, o bien porque no existe este material o por el coste de su elaboración.

- Manejo del campo

Cultivo anterior: generalmente se realizan rotaciones de cultivo lo que implica la alternancia entre cereales, crucíferas o leguminosas. Se debe evitar la siembra de trigo o cebada después de maíz, ya que el principal inóculo de FHB proviene de los residuos de este cultivo.

Prácticas agronómicas: se recomienda enterrar profundo mediante arado o bien retirar los rastrojos del cultivo anterior. Es más eficaz quemar los restos, pero está prohibido en muchas zonas.

Una siembra densa promueve la enfermedad.

El control de malas hierbas es aconsejable ya que pueden actuar como reservorio del inóculo, y también hay que cuidar la aplicación en exceso tanto de nitrógeno como del riego (Naresh Magan, 2004).

- Condiciones ambientales

El clima es uno de los determinantes principales de la ocurrencia de la enfermedad (Parry et al., 1995):

- Clima previo a la antesis: temperaturas medias y secas favorecen el desarrollo de las “*Fusarium* foot rot” y la producción de inóculo en las bases de los tallos.
- Clima en antesis: una lluvia y/o viento intensos favorecen la dispersión de inóculo y que este llegue a las flores en el momento más susceptible.
- Clima en la floración: el clima húmedo y templado favorece el desarrollo de *Fusarium* (Doohan et al., 2003).

- Aplicación de plaguicidas.

La aplicación de herbicidas e insecticidas se deben tener en cuenta porque las malas hierbas pueden ser refugios del patógeno, y los insectos agentes de dispersión.

Cabe hacer especial mención a los fungicidas, aunque ninguno de los que se utilizan actualmente es capaz de un control total de la enfermedad. En parte esto es debido a que: la eficacia del plaguicida depende el momento de aplicación, la cantidad que se puede aplicar está limitada por seguridad para la salud y a que la reducción de la masa fúngica no implica una reducción en la concentración de micotoxinas.

Algunos de los compuestos fungicidas más usados y su efecto (Xu, 2003):

- Guanidinas: la Guazatina se suele utilizar en el tratamiento de semillas y no se aconseja su uso para el FHB ya que se podrían crear resistencias que limitasen su actividad en la fusariosis de las plántulas. Actualmente en desuso.
- Imidazolas: la Bencimidazola no resulta muy activa contra *M. nivale*. La Tiabendazola no produce efectos sobre la enfermedad pero reduce el contenido de DON.
- Morfolinas: el Tridemorph (6-8 ppm) inhibe la producción de T2, pero no disminuye el crecimiento del hongo.
- Bencimidazoles: Carbendazima, y Metil-tiofanato reduce tanto la incidencia como la producción de toxinas DON y nivalenol.
- Mezclas de Estrobilurinas: Dimoxistrobina y Epoxiconazola, Fluoxastrobina y protioconazola, que inhiben la respiración mitocondrial del hongo.
- Triazolas: Bromuconazola, Epoxiconazola, Metconazola, Protioconazola, Tebuconazola, Triadimenol y Tebuconazola, se caracterizan por inhibir una enzima específica que juega un rol fundamental en la síntesis de esteroides, necesarios para la formación de pared celular.
 - Propiconazoles: tiene buenos resultados en el control del hongo pero no se ven diferencias en la producción de DON.
 - Triadimenol y Propiconazola reducen tanto la incidencia como la producción de toxinas como DON.
- Trizolas e Imidazolas: la aplicación de Tebuconazolas y Prochloraz junto con genotipos de resistencia media a alta parece ser la mejor combinación (Parry et al., 1995; HGCA, 2009).

Los puntos de aplicación de plaguicida suelen ser en semillas, después de la emergencia de la tercera hoja, después de la emergencia de la hoja bandera, y después de la emergencia de la espiga. Se reduce el riego si se aplican cantidades apropiadas de fungicidas en la floración y emergencia de la hoja bandera. El spray de espiga para las FHB suele proporcionar protección adicional a los dos últimos internodos, como es el caso de los productos basados en Triazolas. En variedades resistentes puede no ser necesaria la aplicación. El control de FHB en temporadas húmedas es difícil y costoso ya que se suelen utilizar dosis altas de fungicida. Evitar micotoxinas en cereales es especialmente importante en el caso de su uso para consumo humano (Horsley, 2006).

- Control biológico:

Resultados obtenidos por varios grupos demuestran que el uso de diferentes organismos antagonistas puede revelarse como un método complementario eficaz de lucha contra la FHB (HGCA, 2009, 2010). Entre los organismos testados encontramos (Riungu et al., 2008):

- *Sporobolomyces spp*: Reduce significativamente la contaminación en granos.

- *Cladosporium spp.*: Efectivo inoculado antes de antesis es efectivo contra *M. nivale*.
- *Alternaria spp.* : Efectivo en la aplicación tano antes como después de antesis.

Otras especies con las que se han obtenido buenos resultados son (Parry et al., 1995):

- *Clostachys rosea*: suprime la esporulación de *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. proliferatum*, *F. verticillioides* y *F. equiseti*, con un efecto similar a los fungicidas con base de Tebuconazola).
- *Phoma betae* y *Pythium ultimum*: (reducen en un 60% los síntomas de FHB).
- *Pseudomonas fluorescens*: inhibe el crecimiento de *F. culmorum*.

1.4.4.2. FACTORES DE RIESGO EN EL MANEJO POST COSECHA

- Cosecha, Secado y almacenamiento

Se debe evitar o minimizar el contacto con material contaminado con esporas. Se recomienda realizar una limpieza del material durante la propia cosecha y posteriormente secar el grano a bajas temperaturas (Schrodter, 2004). Estas prácticas permiten guardar el grano más de 12 meses sin incrementar los niveles de tricotecenos.

Hay que tener en cuenta que la paja y heno pueden ser una fuente importante de contaminación. Muchos *Fusarium* asociados con pastos, maíz y otros cereales en el campo no pueden crecer en el ensilado ya que son especies aeróbicas. Sin embargo, sí pueden permanecer sus micotoxinas. (Scudamore and Livesey, 1998).

- Procesado

Existen tratamientos con diferentes tipos de soluciones acuosas (NH_4OH , Na_2SO_3 , Na_2CO_3 , H_2O_2) que disminuyen la cantidad de toxina en los granos. Sin embargo no es una práctica aconsejable ya que se incrementa la humedad del material y da lugar a problemas en el almacenamiento (Perkowski, 1998).

Otros tratamientos propuestos incluyen choques térmicos. Por ejemplo (Murphy et al., 2006) plantean una combinación de un pH de 10 y altas temperaturas (100 °C durante 60 min y 120 °C durante 30 min) en una solución buffer que destruye el DON en gran medida.

Hay métodos de separación de granos que permiten discriminar aquellos con mayor contenido en DON dejando un remanente de toxina aceptable a niveles legales:

- Métodos gravimétricos (Tkachuk et al., 1991).
- Por tamaño: Aquellos granos más afectados presentan mayor concentración de DON. Perkowski and Kaczmarek (2002) llevaron a cabo un estudio en el que vieron que la fracción de granos de tamaño inferior a 2.,5mm, que resultaba ser tan solo del 6%, acumulaba el 50% de DON y el 76% de 3-AcDON totales. La cantidad de 3-AcDON siempre se ha reportado como menor que el contenido de DON, lo que puede ser debido a que el primero es un precursor del segundo.

En la Tabla 1.9 se resumen los factores más importantes a tener en cuenta y el impacto de cada uno de ellos en la obtención de una resistencia a FHB aceptable.

Tabla 1.9 Buenas prácticas agronómicas e impacto.

Buenas prácticas agronómicas		Impacto
Rotación y cultivo previo	Evitar maíz como cultivo previo	Alto
Manejo de rastrojos	Minimizar los residuos del cultivo anterior en la superficie del terreno	Alto
Elección de variedad	Elegir las más resistentes	Medio
Control de malas hierbas	Controlar las poblaciones	Bajo
Control de insectos	Controlar las poblaciones	Bajo
Uso de fertilizantes	Usar cantidades óptimas de nutrientes	Bajo
Uso de reguladores de crecimiento	Sólo lo necesario para evitar encamado	Medio
Uso de fungicidas	Considerar un spray de espiga para controlar FHB	Medio
Cosecha y almacenamiento	Realizarla en su momento y realizar buen secado de grano	Medio

1.4.4.3. PREDICCIONES

Existen varias agencias y organismos de evaluación, investigación y predicción de enfermedades que publican listas de variedades recomendadas en función de los factores descritos en el apartado anterior. En general aconsejan ciertas prácticas agronómicas y variedades, que el agricultor puede tener en cuenta junto a las características específicas de su cultivo y localidad. Ejemplo de este tipo de organismos financiados por estado, industria relacionada, agricultores y ganaderos son en España la RAIIF (Red de Alerta e Información Fitosanitaria) y en el caso del Reino Unido:

1. BSPB (British Society of Plant Breeders).
2. IBD (Institute of Brewing and Distilling).
3. MAGB (Maltsters' Association of Great Britain).
4. NABIM (National Association of British and Irish Millers).
5. HGCA (Home-Grown Cereals Authority) es la división del Departamento de Desarrollo de Agricultura y Horticultura.

1.4.5 Resistencia y mejora

Como hemos visto en el apartado 1.4.4, se han propuesto varios métodos para reducir la severidad de la FHB entre los que se encuentran la rotación de cultivos, el control de la época de espigado y el uso de pesticidas. En algunos casos se realiza una separación del grano en dos fracciones según el tamaño y se desecha la de menor calibre ya que en ella están las semillas más afectadas que contendrán mayor concentración de toxina (Perkowski, 1998). Sin embargo, el éxito de estos métodos es limitado, por lo que se hace necesaria la utilización de las herramientas que ofrece la mejora genética vegetal para encontrar nuevas variedades resistentes. Entre estas herramientas cabría destacar la búsqueda de QTL y la selección asistida por marcadores moleculares. En este sentido se presenta una nueva dificultad ya que la resistencia a esta infección tiene carácter cuantitativo y está muy influenciada por el ambiente (Snijders, 1990; Vaneeuwijk et al., 1995).

Diversos trabajos apoyan la existencia de resistencia horizontal en trigo, es decir, que la resistencia sirve para varias especies de *Fusarium* (Vaneeuwijk et al., 1995). Este tipo de resistencia también se denomina no específica, de campo, cuantitativa o

poligénica y normalmente resulta durable en campo. Se ha encontrado resistencia cruzada entre *F.graminearu*, *F.culmorum*, *F. avenaceium* y probablemente *F. nivale*, otros trabajos la muestran entre *F. poae*, *F.sporotrchioides*, *F.acuminatum* y *F.equiseti* (De Nijs et al., 1996; Mesterhazy, 2004). La utilización de genes con efectos aditivos aumentaría el nivel total de resistencia.

Se ha propuesto que al tratarse de una resistencia horizontal y durable la utilización de una única especie de *Fusarium* de gran agresividad sería suficiente de cara a la selección de material resistente (Mesterhazy et al., 2005). En cuanto a la búsqueda de genotipos con bajo contenido de micotoxinas, se ha visto que con la selección de baja severidad también se consigue seleccionar para baja acumulación de DON. En varios trabajos se concluye que la resistencia de la planta es más importante en lo relacionado a la acumulación de DON que la agresividad de la raza del hongo (Mesterhazy, 2002; Langevin et al., 2004).

1.4.5.1. COMPONENTES DE RESISTENCIA

El propio desarrollo de la enfermedad determina diferentes puntos en los que actúan distintos mecanismos de defensa. Estos puntos son los denominados componentes de resistencia que en conjunto conforman la resistencia total.

Existen varios sistemas de nomenclatura para los componentes de resistencia a la FHB. No existe consenso en cómo definir cada tipo de resistencia excepto para la resistencia tipo I y la resistencia tipo II. En esta memoria se seguirá la nomenclatura expuesta por Mesterhazy et al. (2002):

- Tipo I. Resistencia a la invasión.
- Tipo II. Resistencia a la dispersión.
- Tipo III. Resistencia a la infección del grano.
- Tipo IV. Tolerancia.
- Tipo V. Resistencia a la acumulación de toxina. Boutigny et al.(2008) propusieron dividir la resistencia de tipo V, en dos subcomponentes:
 - V-1. Degradación o detoxificación de las toxinas.
 - V-2. Prevención de la biosíntesis de micotoxinas.
- Tipo VI. Resistencia al blanqueamiento tardío.
- Tipo VII. Resistencia a la muerte de la espiga por encima del punto de infección.

Resistencia tipo I. Resistencia a la inicial a la infección o invasión

Medida como incidencia (porcentaje de espigas infectadas) es uno de los principales componentes de resistencia estudiados en cebada, ya que en esta especie la dispersión a través de los haces vasculares de raquis y raquilla es menor que en otros cereales (Zhu et al., 1999). La insensibilidad de la planta al DON no tiene interés en este tipo de resistencia ya que el DON no aparece en este estadio temprano de la enfermedad. En un estudio Muelbauer et al. (2005) examinaron la acumulación de transcritos durante el proceso de infección encontrando tres estadios:

- Entre los 0 y 2 días después de la inoculación
- Entre los 2 y 4 días, donde se producía la mayor inducción de genes, entre ellos los de la ruta biocinética del triptófano, indicando una respuesta específica de defensa del hospedador.
- Y entre los 4 y 6 días.

Resistencia tipo II. Resistencia a la dispersión

Es la más importante en trigo ya que la dispersión de flor a flor se puede producir con gran rapidez. Como ya se ha comentado, en el caso de cebada el crecimiento de las hifas está inhibido en raquis y raquilla, aún bajo la presencia de micotoxinas, lo que explica la menor dispersión del hongo en comparación con el trigo, o lo que es lo mismo, la mayor resistencia de tipo II de la cebada. Esta inhibición no se produce por engrosamiento de la pared celular (Jansen et al., 2005).

La resistencia de tipo II es de naturaleza poligénica y es la que se usa habitualmente en los programas de mejora. Para medirla se inocula una flor o espiguilla de mitad de la espiga y se observa su dispersión al resto de la espiga. Una de las respuestas de la planta que define esta resistencia es la reacción de hipersensibilidad, la formación de aposiciones en la paredes celulares de las plantas resistentes (Kang and Buchenauer, 2000). Aunque dicha reacción no acaba con la dispersión de la infección, por lo menos la retrasa, con lo que la planta puede avanzar en la maduración de los granos. Se considera que el DON puede contribuir a la rotura de este tipo de resistencia por la inactivación de la respuesta de defensa debido a la acción directa que ejerce sobre las células del raquis.

Los contenidos de ergosterol están directamente relacionados con la invasión de hifas y la cantidad de masa fúngica, por tanto se utiliza como parámetro de medición de la resistencia de tipo II (Schroeder, 1955).

Resistencia tipo III. Resistencia a la infección del grano

Esta resistencia supone una menor infección de grano y por tanto presencia de grano con menos toxina (Mesterhazy et al., 1999). Esta resistencia la componen la presencia de sustancias fenólicas o de capas específicas de la semilla en el momento de desarrollo del grano que impedirían la acción de las toxinas.

Resistencia tipo IV. Tolerancia

Se define tolerancia cuando se observa una sintomatología severa de la enfermedad pero sin causar pérdidas importantes en calidad o rendimiento. En ella influyen componentes como la rapidez del llenado del grano o la baja sensibilidad a los tricotecenos.

Resistencia tipo V. Limitación de la cantidad de tricotecenos en el grano. (Resistencia a la acumulación de toxina)

En un principio Miller (1985) la propuso como resistencia tipo III ya que constituía un nuevo tipo de resistencia no definido. En su trabajo Miller y Arnison (1986) dieron con un cultivar de trigo, Frontana, que presentaba pocos síntomas a pesar de portar una gran biomasa de *F. graminearum*. Examinando cuidadosamente las muestras determinaron que contenía niveles bajos de toxina y por tanto debía existir este nuevo componente de resistencia. No era nuevo el conocimiento de que algunas plantas eran capaces de degradar toxinas, como por ejemplo el caso de las guisantes con el ácido fusárico en infecciones con *Fusarium lycopersici* Sacc. (Jost, 1965).

En el siguiente trabajo que realizaron (Wang and Miller, 1988) demostraron la capacidad de degradación de DON en plantas resistentes. Estas plantas contenían una peptidil transferasa mutante a la que no puede atacar el DON, lo que les confería insensibilidad y por tanto tolerancia. Se sabe que muchas levaduras, células de

mamíferos, hongos filamentosos y la planta *Baccharis megapotamica* portan enzimas peptidil transferasas tolerantes a los tricotecenos (Anon, 1983; Wang and Miller, 1988).

Snijders and Krechting (1992) determinaron que la resistencia asociada a menor acumulación de DON realmente es un subtipo de la resistencia tipo III ya que el DON juega un papel en la patogenicidad. El DON se transporta desde la cubierta al interior del grano que posteriormente será colonizado por el hongo. En las plantas donde este transporte es inhibido no se produce colonización. Sin embargo a calado más hondo la separación de este componente de resistencia en un nuevo tipo porque la dispersión se puede producir de igual manera y por su especial interés en la salud y seguridad alimentaria.

- Resistencia tipo V, subtipo V-1. Detoxificación.

Un mecanismo ampliamente descrito para la detoxificación es la glucosilación de los tricotecenos tipo B. Ha sido descrita in vivo en trigo y se ha llegado a identificar una UDP-glucosiltransferasa encargada de secuestrar DON en *Arabidopsis* (Boutigny et al., 2008). Lemmens et al. (2005) establecieron una relación entre la ratio DON glucosilado /DON y la resistencia que exhibían las plantas de trigo, llegando a detectar un QTL, el *Qfhs.ndsu-3BS*, que presumiblemente contiene una DON glucosiltransferasa o un regulador de ésta. El hecho de producir toxinas glucosilizadas en planta no implica que se no produzca una reversión en el tracto digestivo de animales y humanos, por lo que hay que realizar estudios en este sentido.

Además de la glicosilación, se han propuesto otros dos métodos de detoxificación de DON mediante modificación química: la acetilación y la de-epoxidación:

La 3-O-acetilación es el proceso de autoprotección que siguen los propios patógenos *Fusarium*. Las formas acetiladas de DON, como 15-AcDON y 3-AcDON, se consideran menos tóxicas para humanos y animales que las que no lo están. Ejemplos de éxito con esta idea fueron la integración en las plantas de tabaco del gen de la tabtoxina acetiltransferasa que acetila la fitotoxina tabtoxina producida por *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, causante de la enfermedad “wildfire disease” (Harms, 1992), o el caso de plantas de arroz transgénicas con menor sensibilidad a DON gracias a la transferencia del gen *Tri101* que codifica una 3-O-acetyltransferasa de tricotecenos (Ohsato, 2007).

La toxicidad de los tricotecenos viene dada por la presencia de un anillo epóxido en posición 12 y 13. La reducción del epóxido consistiría en la eliminación del oxígeno del grupo epóxido para la formación de un doble enlace C-C. Se han detectado epoxidasas en el rumen bovino que detoxifican tricotecenos tipo A y deoxinivalenol (Boutigny et al., 2008).

La búsqueda de genes de enzimas detoxificadoras de fitotoxinas debe comenzar por el propio hongo productor, ya que normalmente tienen la capacidad de metabolizar estas sustancias. También se ha propuesto la búsqueda de inhibidores de enzimas de *Fusarium* para evitar su patogenicidad. Entre estas enzimas estarían incluidas degradadoras de PC y proteinasas y posiblemente (1-3)- β -glucanasas, quitinasas y endoproteinasas (Schwarz et al., 2002). *F. graminearum* secreta enzimas degradadoras de xilanos, pectinas y celulosas de las paredes celulares de la planta anfitriona. La expresión de inhibidores específicos como las inhibidores de poligalacturonasas o xilanasas TAXI o XIP de trigo pueden evitar la entrada del hongo (Jansen et al., 2005).

- Resistencia tipo V, subtipo V-2. Reducción de la producción de toxina.

Algunas sustancias producidas por la planta de manera constitutiva o en respuesta al ataque del hongo pueden reducir la cantidad de micotoxina. Estos compuestos no solo

tienen un efecto en la toxina secretada, sino también en la biosíntesis. Entre estas sustancias protectoras nos encontramos: compuestos fenólicos, carotenoides, péptidos antifúngicos, peróxido de hidrogeno y productos de la oxidación de lípidos. Las sustancias promotoras de ambiente oxidativo promueven la producción de toxina, mientras que las de actividad antioxidativa reducen su biosíntesis (Boutigny et al., 2008).

Otros tipos

- Resistencia a los efectos de los tricotecenos (Bushnell et al., 2004).

- Resistencia activa: Activación de las defensas del anfitrión.

Se ha visto que al igual que ocurre con otras enfermedades, la inoculación de macroconidia provoca la activación de defensas sistémicas como son la activación de genes de peroxidasas, PR1, PR2; glucanasas, PR3; quitinasas, PR4 y “thaumatin-like proteins” PR5 (Pritsch et al., 2000; Pritsch et al., 2001). Esto forma parte de la activación del sistema SAR (Systemic Acquired Resistance), la respuesta en ausencia de contacto directo con el patógeno. Tanto la activación local como sistémica de las defensas en este estudio se formó entre las 24 y las 48 horas después de la inoculación. Varios grupo han obtenido trigo transgénico con tioninas y TLP's (Thaumatin Like Proteins) que dañan las membranas celulares del hongo al hacerlas permeables, y con β -1,3-glucanasas que degradan los enlaces de los polisacáridos de la PC. Las líneas con los tres transgenes mostraron baja severidad de FHB, baja concentración de DON y bajo porcentaje de granos infectados. Algunos de estos autores interpretaron los resultados como un retraso en la aparición de los síntomas (Chen et al., 1999; Anand et al., 2003; Mackintosh et al., 2007).

- Resistencia Pasiva.

- Arquitectura de la planta: plantas de altura media-alta, con gran distancia entre entrenudos, hojas separadas, y amplia longitud de los internodos superiores ayudan a aumentar la resistencia. La producción de cera limita la humedad disponible y también disminuye la susceptibilidad (Yoshida et al., 2005).
- La morfología de las espigas: la presencia de barbas, espigas compactas, con ángulo de inserción de la flor pequeño y un tamaño grande de las flores laterales las hacen más susceptibles. En cuanto al tipo de espiga, la severidad de cebada de dos carreras resultó inferior a la de seis carreras (Urrea et al., 2005), a pesar de encontrarse una cantidad de DON similar en ambos tipos. La extrusión de las anteras durante la antesis y la retención de estas después de que ocurra aumentan la susceptibilidad.

- Escape.

Relacionado con evitar la coincidencia entre el periodo crítico de infección (que va desde la floración al llenado de grano) y una climatología favorable para ésta (la presencia de humedad y temperaturas medias). Se trata pues de seleccionar una fenología adecuada de nuestro cultivo: Se puede recurrir a genotipos con periodos de llenado de grano cortos, ya que las capas de la testa se vuelven más gruesas a medida que madura el grano volviéndose más resistentes a la entrada del hongo.

1.4.6 Mejora y QTL's

Hay que tener en cuenta que el tipo de evolución de la enfermedad en cada especie determinará el componente de resistencia sobre el que se aplicarán mayores esfuerzos en la mejora. Por ejemplo, en el caso del trigo en el que el principal problema es que la infección se extiende muy rápidamente en las espigas, el punto en que se hará más énfasis es en el tipo de resistencia II, resistencia a la dispersión. En el caso de la cebada, en la que la dispersión no es uno de los componentes con mayor peso, habrá que realizar una mejora de conjunto, “holística”, en que se tengan en cuenta los diferentes tipos de resistencia y se integren para obtener el mejor ideotipo posible. Por tanto conocer e identificar los momentos más susceptibles es imprescindible para llevar a cabo un buen programa de mejora.

Esto nos lleva a recalcar la necesidad de un buen sistema de fenotipado que determine, que defina de manera correcta y clara, el carácter para el que estamos seleccionando. Se ha de concretar el tipo de materia vegetal y estadio sobre el que se realiza el fenotipado, las características que se van a observar y como se va a realizar su medición.

Hanson et al. (1950) comentó que no se puede encontrar resistencia en condiciones ambientales adversas debido a la baja severidad de la enfermedad, es decir, es absolutamente necesaria una presión de selección lo suficientemente fuerte que haga sobresalir los genotipos resistentes.

Se puede revisar Steffenson (2003) como introducción a la mejora para resistencia a FHB.

Los caracteres más estudiados (Bai et al., 2001) directamente relacionados con la enfermedad son:

- contenido de DON.
- severidad de FHB.
- proporción de espigas infectadas.
- peso seco de 100 semillas.
- porcentaje de granos infectados.
- área bajo la curva de progreso de la enfermedad (AUDPC).

Los caracteres que influyen en la incidencia y proceso de infección son los relacionados con la arquitectura de la planta:

- el número de nudos por cm de raquis.
- longitud de raíz.
- los días a espigado.
- la altura de la planta.
- ángulo, densidad y tipo de espiga.

La selección fenotípica depende del clima, es mucho más laboriosa y ocupa más tiempo que la genética. Por ejemplo en el caso de la selección para la resistencia tipo V, se suele seleccionar para bajo daño de grano ya que los granos “scabby” y “tombstone” son los principales portadores de toxinas (Mirocha et al., 1998; Mesterhazy et al., 2005), pero estos datos son muy variables entre diferentes años. En el caso de una gran variación genotipo x ambiente se hace más interesante la utilización de la selección asistida por marcadores (Moreau et al., 1998; Hospital, 2002). El uso de marcadores moleculares proporciona una herramienta para la identificación y localización de loci responsables de la variabilidad de caracteres heredados de manera cuantitativa.

Respecto a los marcadores moleculares, se han realizado varios trabajos de búsqueda de QTL's y genes candidatos promotores de resistencia. Entre ellos destaco:

1.4.6.1. QTL'S DE RESISTENCIA A FHB EN TRIGO

En trigo se han encontrado QTL's en 20 de sus 21 cromosomas (Champeil et al., 2004; Buerstmayr et al., 2009). Entre ellos cabe destacar los QTL's de los cromosomas 1B, 2A, 3A, 3B, 4B, 5A, 6B, 6D, 7A, 7B, detectados en diferentes poblaciones y cultivares (Buerstmayr et al., 2002; Zhou et al., 2002; Buerstmayr et al., 2003; Somers et al., 2003; Steiner et al., 2004). Chen et al. (2006) validaron los del 3BS, con un efecto mayor en la resistencia tipo II, y acumulación de DON; y el del 5AS, con efecto sobre la resistencia de tipo I y acumulación de DON. Mardi et al. (2005) validaron el 3BS y el 2DL coincidente con el detectado por Somers et al. (2003).

En la herencia de la resistencia se describen tanto efectos de dominancia como de aditividad, siendo este último el factor esencial de la variación observada como demostraron estudios sobre la habilidad de combinación general y específica (Snijders, 1990; Miedaner et al., 1993; Hall and Van Sanford, 2003; Mardi et al., 2004).

Tres “backgrounds” genéticos se han identificado como fuentes de resistencia: trigos de invierno de Europa del Este, trigos de primavera de Japón y China, y trigos de primavera de Brasil e Italia.

El problema hasta ahora es que la fuente de resistencia más utilizada en programas de mejora procede de una única fuente, de la variedad Sumai3, de origen chino, por ser ésta estable además de estar unida a un conjunto de buenas características agronómicas (buen rendimiento y resistencia a roya y mildiu), por lo que se hace necesario seguir con la búsqueda de nuevos puntos de partida para implementar los programas de mejora.

Muchos de los genomas de cereales son sinténicos, es decir, se conservan, comparten el orden y posición entre especies (Dubcovsky et al., 1996; Gale and Devos, 1998). En el caso de la resistencia a *Fusarium* se ha comprobado la sintenia de los QTL de los cromosomas 2 y 3BS de trigo con los cebada. Se encontró que únicamente el QTL del cromosoma3 presenta marcadores flanqueantes comunes indicando que se trata de una región sinténica. Este QTL en cebada se ha identificado en dos estudios diferentes (De La Pena et al., 1999; Ma et al., 2000).

1.4.6.2. QTL'S DE RESISTENCIA A FHB EN CEBADA

Existen bastantes datos sobre QTL's relacionados con la resistencia a *Fusarium* en cebada. Se puede acceder de manera fácil a muchos de ellos junto a sus características en las páginas web www.gramene.org o de GrainGenes.

Se han encontrado QTL en todos los cromosomas de cebada. Por ejemplo, (De La Pena et al. (1999) encontraron QTL's relacionados con resistencia a FHB en todos los cromosomas excepto el 6 y (Zhu et al., 1999) en todos menos el 5H. Muchos de estos QTL's son coincidentes con genes y QTL's de caracteres arquitectónicos de la planta, como por ejemplo la altura, día de espigado, el número de carreras (*vr1*) y la cleistogamia (*cly1*, *cly2*), con lo que queda por elucidar si la resistencia se debe a un efecto pleiotrópico de estos genes o a nuevos genes ligados a ellos. Por tanto los marcadores que se podrían utilizar a priori serían aquellos que presenten un efecto alto sobre la media de la población y no coincidentes con estos caracteres que influyen la evolución de la enfermedad.

Un resumen de QTL's encontrados en cebada aparece reflejado en la Tabla 1.10:

Tabla 1.10 Resumen de los principales QTL's encontrados para resistencia a la FHB.

Cromosoma	QTL'S	Bibliografía
1H	Acumulación de DON y KD (<i>kernel discoloration</i>) relacionados con la altura y el día a espigado; severidad de FHB	De la Pena et al. (1999), Ma et al. (2000).
2H	Acumulación de DON, severidad de FHB, KD, días a espigado, tipo de espiga, repuesta al fotoperiodo, espiga corta, altura de la planta y número de nodos en el raquis, semillas por inflorescencia	De La Pena et al. (1999), Zhu et al. (1999), Ma et al. (2000), Kolb et al. (2001), Canci et al. (2003), Mesfin et al. (2003), Horsley et al. (2005)
3H	Severidad a FHB, KD y altura	De La Pena et al. (1999), Zhu et al. (1999), Ma et al. (2000), Kolb et al. (2001)
4H	KD, acumulación de DON altura de planta, semillas por inflorescencia, tamaño de flor lateral, severidad de FHB	De La Pena et al. (1999), Zhu et al. (1999), Ma et al. (2000)
5H	Severidad de FHB, altura y días a espigado	Zhu et al. (1999), Ma et al. (2000), Kolb et al. (2001)
6H	KD, acumulación de DON, severidad de FHB	De La Pena et al. (1999), Zhu et al. (1999), Canci et al. (2003)
7H	KD, acumulación de DON, altura de la planta, severidad de FHB y días a espigado	De La Pena et al. (1999), Ma et al. (2000)

1.4.7 Selección *in vitro* para estrés biótico

En las últimas dos décadas se han llevado a cabo trabajos de selección *in vitro* que permiten testar un gran número de individuos en un pequeño espacio y bajo condiciones controladas, reduciendo así la variabilidad producida por la interacción ambiental. Igualmente se consigue un ahorro importante en el espacio del invernadero, del campo.

Un programa de selección *in vitro* consiste en tres pasos fundamentales:

- Producción de una población segregante para el carácter.
- Realizar la selección *in vitro*: escoger el material de partida, agente de selección, condiciones y método.
- Analizar los regenerantes: En todos los ensayos de selección *in vitro* una de las cuestiones principales es qué grado de correlación existe entre los resultados en condiciones artificiales y las naturales. Para comprobar la estabilidad de la resistencia es necesario realizar ensayos multilocales en años sucesivos con una alta presión de selección (Remotti, 1998).

El material que debe expresar la resistencia puede ser de diversa tipología. Entre ellos se destacan los protoplastos, callos, suspensiones celulares y embriones. Como se apuntó en la introducción general, existen diversos trabajos donde se recoge la posibilidad de realizar una selección en el estadio de microspora ya que muchos de los genes que se transcriben durante el desarrollo del polen también lo hacen en las partes vegetativas de la planta (Verma et al., 1988). Además, en distintos trabajos se ha encontrado una excelente correlación entre la resistencia a patógenos a nivel de planta y la insensibilidad a toxinas a nivel celular (van den Bulk, 1991). Hay que tener en cuenta

problemas que se pueden presentar por la naturaleza del material vegetal utilizado. En los casos anteriores un cuello de botella importante es el porcentaje de regeneración y la obtención de plántulas albinas en cereales (Bruins et al., 1993)

Se ha demostrado que la selección *in vitro* con toxinas da como resultado una mayor frecuencia de recuperación de plantas resistentes. Sin embargo, algunos autores apoyan la posición contraria ya que en muchos estudios con toxinas no han obtenido los resultados esperados, es decir, no se han obtenido diferencias significativas para el número de regenerantes resistentes entre el medio de selección y el control. Esto, lejos de hacernos pensar en que no es posible realizar una selección *in vitro* para estrés biótico, subraya la obligación de conocer pormenorizadamente el papel que juegan las toxinas en la patogénesis, su modo de acción, sus propiedades, y las interacciones con los tejidos.

Casos claros en los que no se consigue la ansiada resistencia son consecuencia de que la resistencia no se expresa a nivel del explanto escogido, como el caso del *gen N* que confiere hipersensibilidad al TMV en tabaco que se expresa en callo y no en protoplasto; a que la elección del agente de selección no es la correcta o a las propias condiciones *in vitro*. Los nutrientes en el medio también afectan a la respuesta de resistencia, por ejemplo, altos niveles de magnesio o calcio afectan a la formación de suberina, el exceso de nitrógeno puede inhibir la síntesis de compuestos fenólicos con la subsiguiente inhibición de la producción de fitoalexinas y la no lignificación de las paredes secundarias. Así mismo, el estatus de nutrientes del tejido puede afectar a la respuesta a las toxinas.

Las incompatibilidades que podemos tener *in vitro* respecto a *in vivo* en el establecimiento de la combinación planta-patógeno pueden ser debidas a la producción de nuevas sustancias antimicrobianas del explanto, o a la carencia de tejidos específicos en la planta involucrados en la interacción, por ejemplo aquellos implicados en el reconocimiento del hospedador o que confieran resistencia (Dix, 1990).

Para solucionar esto se establecieron cultivos duales donde el explanto procedía de tejido infectado. De todas maneras, el sistema de selección *in vitro* mediante cultivo dual con inoculación del patógeno o toxina *in vitro* ha dado buenos resultados tanto para parásitos biotróficos y facultativos como para virus, si bien en virus en mejor usar la técnica de explanto ya infectado (Dix, 1990).

Para realizar una correcta selección *in vitro* se debe tener un buen agente selectivo que aisle las células con la característica específica que queremos seleccionar. En el proceso de selección *in vitro* para resistencia a enfermedades hay que tener en cuenta que no todos los patógenos producen toxinas fácilmente caracterizables. Es por ello por lo que se suelen utilizar filtrados de cultivos de patógenos como agente selectivo. El problema radica en que al tratarse de un cóctel de sustancias no se sabe realmente sobre qué carácter se realiza la presión de selección, no se sabe en concreto qué se selecciona. Por esto es preferible usar la toxina purificada. Podemos clasificarlas en dos grupos según la especialización en la infección de huésped: las huésped-específicas que actúan en el proceso de infección y desarrollo de la enfermedad, por tanto deseables para realizar el cribado; y las no huésped-específicas de las que normalmente no se conocen bien sus funciones (Remotti, 1998).

Otra clasificación de los tipos de toxinas que nos podemos encontrar (Yoder, 1980) y que resulta muy útil en los estudios de resistencia/susceptibilidad:

- Factor de patogenicidad que son siempre toxinas huésped-específicas (Strobel, 1974). Están involucradas en el proceso de infección temprano.
- Factor de virulencia, aquellas que pueden ser tanto huésped-específicas como no. Controlan la agresividad del patógeno. Están implicados en la

colonización de los tejidos y el desarrollo de síntomas una vez establecida la infección. En muchos casos solo se producen si existe contacto con el metabolismo del huésped o en la presencia de ciertos metabolitos. Nos encontramos este tipo de toxinas en patógenos necro y hemibiotróficos, en los biotrófico no existen tantas referencias (Jones, 1990).

- Sustancias no determinantes de enfermedad.

Para saber si una toxina es determinante de la enfermedad (factor de patogenicidad y/o virulencia) se deben realizar ensayos de mutantes no productores de la sustancia, “*Tox*⁻”, aunque esto es muy difícil en patógenos de manejo complejo.

La selección *in vitro* con toxinas huésped-específicas generalmente conduce al descubrimiento de una resistencia cualitativa monogénica, fácilmente superable por el agente patógeno. La utilización de toxinas no específicas como agente selectivo puede tener un valor adicional, ya que conseguiríamos una resistencia poligénica. La selección con extractos o filtrados de cultivos generalmente incurre en artefactos debido a la presencia de toxinas no determinantes de la enfermedad, como altos niveles de sales y hormonas.

Van den Bulk (1991) nos expone una recopilación de resultados de trabajos en los que se han seguido tres estrategias de selección *in vitro* para la búsqueda de resistencia a estrés biótico. Estas aproximaciones son:

- Selección de resistentes a nivel de planta: testando plantas provenientes de cruzamientos, procesos mutagénicos y variación somaclonal.
- Selección *in vitro* con filtrados de cultivos y fitotoxinas
- Selección *in vitro* con patógenos

Para el caso concreto de *Fusarium* hay una amplia bibliografía donde se recogen técnicas de selección *in vitro* con suspensiones celulares en alfalfa (Binarova et al., 1990), en microsporas, somaclones y callos de trigo (Ahmed et al., 1991; Fadel and Wenzel, 1993; Ahmed et al., 1996; Yang et al., 1998) y en otros sistemas (Remotti, 1998). Se encuentran descritos diferentes métodos destinados a selección plantas de trigo con alta tolerancia a niveles agresivos de toxinas. Se han utilizado tanto extractos de cultivos de *Fusarium* con metabolitos tóxicos como las propias micotoxinas purificadas. La selección se ha realizado en germinación de semillas, plántulas, callos, coleóptilos y microsporas, encontrándose en algunos casos una alta correlación entre los test *in vitro* y la resistencia a FHB (Wang and Miller, 1988; Wakulinski, 1989), aunque en otros trabajos esto no se ha reflejado (Bruins et al., 1993). La selección con ácido fusárico se ha demostrado útil en la mejora de resistencia de banana, gladiolos, alfalfa, cebada, trigo y patata, piña y tomate (Svabova and Lebeda, 2005).

En cebada existen muy pocas referencias de selección *in vitro* para resistencia a *Fusarium*. En ellas se usaron como material de selección callos derivados de embriones (Chawla and Wenzel, 1987) o bien suspensiones celulares embriogénicas (Wenzel and Foroughi-Wehr, 1990).

A pesar de que se sigue necesitando una evaluación fenotípica para determinar la contribución de cada mecanismo de resistencia a la resistencia total, la aplicación de métodos de selección *in vitro* en fases tempranas de los programas de mejora puede reducir el número de líneas con bajos niveles de DON que se deben evaluar en campo, con lo que minimiza el esfuerzo que representa la evaluación fenotípica (Ruckenbauer et al., 2001).

2. OBJETIVOS

OBJETIVOS

La selección *in vitro* resulta ser una herramienta valiosa para la búsqueda de genotipos concretos en diversos momentos de un programa de mejora. Por ello, el estudio de técnicas que cubran la selección tanto para estreses abióticos como bióticos pueden resultar de gran interés.

El objetivo general de este proyecto es validar un método de selección *in vitro* para plantas doble haploides (DH) como sistema de cribado temprano. Para comprobar su viabilidad se han determinado dos objetivos específicos, cada uno de ellos con varios subjetivos.

A. Determinar la utilidad del método de selección *in vitro* para resistencia a boro.

- Producir una población de líneas DH a partir de plantas F1 del cruzamiento Clipper x Sahara.
- Determinar la concentración de cribado a utilizar en el sistema de selección *in vitro*.
- Realizar la selección *in vitro* del material.
- Fenotipar la población para el carácter resistencia a boro.
- Genotipar la población para los tres genes conocidos de resistencia principal.
- Integrar los resultados.

B. Determinar la utilidad del método de selección *in vitro* para resistencia a deoxinivalenol.

- Producir una población de líneas DH a partir de plantas F1 del cruzamiento Chevron x PI393833.
- Determinar la concentración de cribado a utilizar en el sistema de selección *in vitro*.
- Realizar la selección *in vitro* del material.
- Fenotipar la población para el carácter resistencia a deoxinivalenol.
- Genotipar la población, realizar el mapa genético y buscar QTL's para resistencia a deoxinivalenol.
- Integrar los resultados.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL GENERAL

Las variedades de cebada utilizadas en este trabajo aparecen relacionadas en la Tabla 3.1. En general, estas variedades fueron seleccionadas por su comportamiento frente a estreses abióticos y bióticos, en concreto resistencia o susceptibilidad a boro o a la infección por *Fusarium* spp., así como por la disponibilidad de literatura de estudios relacionados con ellas.

Tabla 3.1 Variedades utilizadas y sus características generales

Genotipo	Procedencia	Nº de carreras	Tipo	Características
Sahara	África del Norte	6	Primavera	Cultivar local resistente a boro y sequía.
Clipper	Australia	2	Primavera	Sensible a boro. Alta producción.
Igri	Alemania	2	Invierno	Sensible a sequía. Alta producción.
Albacete	España	6	Invierno	Cultivar resistente a sequía.
Legacy	Estados Unidos	6	Invierno	Sensible a FHB. Baja producción.
Plaisant	Francia	6	Invierno	Alta producción.
Steptoe	Estados Unidos	6	Invierno	Resistencia media a boro.
Chevron	Suiza	6	Primavera	Resistente a <i>Fusarium</i> .
PI383933	Estados Unidos	6	Primavera	Línea sensible a <i>Fusarium</i> .

3.2. CONDICIONES GENERALES DE CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS

Las plantas fueron cultivadas en el invernadero y/o cámaras de crecimiento. Después de cuatro semanas de vernalización en cámara de crecimiento a 4°C con un fotoperiodo de 8 h de luz a 100 mE/m²s² se transfirieron a invernadero o a cámaras de crecimiento con una temperatura de 10-12°C y un fotoperiodo de 12 h de luz a 500 mE/m²s² durante 1 mes. Posteriormente se cambiaron las condiciones de temperatura a 18-21°C noche/día manteniendo el periodo de luz en 16 h y el de oscuridad en 8h. Se aplicó fertilizante comercial 15:15:15 (N:P:K) una vez cada dos semanas (Cistué et al., 1998).

3.3. PRODUCCIÓN DE DOBLEHAPLOIDES

3.3.1. Material vegetal

Se produjeron cuatro poblaciones de doble haploides. Las plantas donantes de anteras de cada una de estas poblaciones fueron las plantas F1 de los cruzamientos: Sahara x Clipper, Clipper x Sahara, Chevron x PI383933 y PI383933 x Chevron.

Siendo las dos primeras destinadas al estudio de la tolerancia a toxicidad por boro y las otras dos para el estudio de la resistencia a DON.

3.3.2. Medios de cultivo

Todos los medios están descritos por Cistué et al, (2004). Todos los productos y reactivos fueron adquiridos a Sigma Aldrich Química si no se indica de otra manera.

- **Medio de pretratamiento “Manitol 0.3M”**

La composición del medio de pretratamiento aparece descrita en la Tabla 3.2. El procedimiento consiste en mezclar en un agitador el manitol, el cloruro cálcico y la mitad del agua destilada, aplicando un poco de calor para facilitar su disolución. Se esteriliza por filtración con una bomba de vacío y filtro Millipore de 0.22 μm de tamaño de poro. La agarosa y el resto de agua destilada se autoclavan. Posteriormente se mezclaron ambas partes en una cámara de flujo laminar y se dispensaron 8 ml en placas Petri de 6 cm de diámetro.

Tabla 3.2. Composición del medio de Pretratamiento.

COMPONENTE	g/l
Agarosa Sea Plaque	8,00
Manitol	127,54
Cloruro cálcico	5,88

- **Medio de inducción: “FGH Líquido”, “FHG-Ficoll 200” y “FHG-Ficoll 400”**

El medio FHG (Hunter, 1988), cuya composición se describe en la Tabla 3.3, es una modificación del medio MS (Murashige and Skoog, 1962).

Para facilitar la preparación de los medios, los macronutrientes, micronutrientes, hierro, vitaminas e inositol se mezclaron previamente en una solución stock concentrada que se guardó a -20°C hasta su uso.

Para hacer la mezcla se disuelve la cantidad de Ficoll correspondiente a cada tipo de medio en agua destilada (Tabla 3.4), casi hasta ebullición. Se deja enfriar y se añade la disolución del resto de los componentes del medio. Se ajusta el pH a 5,8 con HCl 1N o NaOH 1N y se esteriliza por filtración con filtros Millipore de 0.22 μm de tamaño de poro y una bomba de vacío.

Tabla 3.3. Composición del medio FHG (Hunter)

MACRONUTRIENTES	g/l
KNO ₃	3,80
NH ₄ NO ₃	3,30
KH ₂ PO ₄	3,40
CaCl ₂ 2H ₂ O	8,80
MgSO ₄ 7H ₂ O	7,40
MICRONUTRIENTES	mg/l
MnSO ₄ 7H ₂ O	169,00
ZnSO ₄ 7H ₂ O	86,00
H ₃ BO ₃	62,00
KI	8,30
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,25
CoCl ₂ 6H ₂ O	0,25
NaMoO ₄ 2H ₂ O	5,00
HIERRO	mg/l
FeNa(EDTA) ₂	0,80
VITAMINAS	mg/l
Tiamina-HCl	0,02
HORMONAS	mg/l
BAP	1,00
OTROS	g/l
Inositol	0,40
Glutamina	2,92
Maltosa	31,00
Ficoll 400	200,00

Tabla 3.4. Contenido de Ficoll 400 necesario para los medios “FGH Líquido”, “FHG-Ficoll 200” y “FHG-Ficoll 400”.

Medio (1L)	Ficoll 400 (g/L)
FHG-Líquido	0
FHG-Ficoll 200 (semisólido)	200
FHG-Ficoll 400 (semisólido)	400

- **Medio de regeneración: “FHG-Regeneración”**

La composición de este medio “FHG (Hunter) – Regeneracion” está modificada respecto al Hunter original al cambiar la glutamina por nitrato (Tabla 3.5)

Previamente se preparó un stock concentrado de micronutrientes, macronutrientes, tiamina e inositol.

Para su elaboración se pesa el gelrite y dispensa en la mitad del volumen final del medio en agua destilada. Se autoclava. Por otro lado se prepara una disolución con el resto de los componentes del medio, se ajusta el pH a 5,8 y se esteriliza por filtración con filtros Milipore de 0.22 μm de tamaño de poro. Finalmente se mezclan ambas partes en una cámara de flujo laminar y se dispensan en placas Petri estériles de 6cm de diámetro.

Tabla 3.5. Composición del medio FHG (Hunter)

MACRONUTRIENTES	g/l
KNO ₃	3,80
NH ₄ NO ₃	3,30
KH ₂ PO ₄	3,40
CaCl ₂ 2H ₂ O	8,80
MgSO ₄ 7H ₂ O	7,40
MICRONUTRIENTES	mg/l
MnSO ₄ 7H ₂ O	169,00
ZnSO ₄ 7H ₂ O	86,00
H ₃ BO ₃	62,00
KI	8,30
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,25
CoCl ₂ 6H ₂ O	0,25
NaMoO ₄ 2H ₂ O	5,00
HIERRO	mg/l
FeNa(EDTA) ₂	0,80
VITAMINAS	mg/l
Tiamina-HCl	0,02
HORMONAS	mg/l
BAP	1,00
IAA	0,50
OTROS	g/l
Maltosa	31,00
Gelrite	3,00
Inositol	0,40

- **Medio de enraizamiento: “MS-ANA”**

Este medio es una modificación del medio MS (Murashige and Skoog, 1962) consistente en la mitad de concentración y al que se le ha añadido ácido naftalenacético (ANA).

Para su elaboración se dispensan 15 mg de Gelrite en cada Caja Magenta y se le añaden 50 ml de disolución del resto de los componentes del medio por caja, previamente ajustado el pH a 5,8. Se autoclavan para esterilizar y se sellan con Parafilm hasta su uso.

Tabla 3.6. Composición del medio de Enraizamiento MS+ANA
(modificación de Murashige&Skoog 1962)

MACRONUTRIENTES	g/l
KNO ₃	1,90
NH ₄ NO ₃	1,65
KH ₂ PO ₄	0,17
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,44
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,37
MICRONUTRIENTES	mg/l
MnSO ₄ 7H ₂ O	16,90
ZnSO ₄ 7H ₂ O	8,60
H ₃ BO ₃	6,20
KI	0,83
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ 6H ₂ O	0,025
NaMoO ₄ 2H ₂ O	0,25
HIERRO	mg/l
FeNa(EDTA)2	27,85
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,25
VITAMINAS	mg/l
Tiamina-HCl	0,10
Pirodoxina	0,50
Nicotinamida	0,50
Glicina	2,00
OTROS	g/l
Caseína	1,0
Sacarosa	30,00
Inositol	0,10
Agar	10,00

3.3.3. Cultivo de anteras

Este protocolo está descrito en Cistué et al. (2004). Consta de las siguientes fases que resumen en la Tabla 3.7 y que se describen a continuación.

Tabla 3.7 Resumen de las fases del cultivo de anteras

FASE	PROCESO	OBTENCION DE
1.Cosecha de espigas	Recolección de espigas y extracción de anteras	Anteras estériles
2.Pretratamiento de anteras	Siembra de las anteras en medio de pretratamiento para inducir reprogramación de las microsporas	Anteras con microsporas viables reprogramadas
3.Inducción de embriogénesis en las microsporas viables	Siembra de las anteras pretratadas en medio de inducción para inducir la embriogénesis de las microsporas	Embriones y callos
4.Regeración de los embriones obtenidos	Repicado en medio de regeneración de los embriones obtenidos	Plántulas
5. Enraizamiento	Repicado de las plántulas en medio de enraizamiento en cajas Magenta	Plántulas enraizadas
6. Traslado a maceta	Cultivo de plántulas enraizadas en maceta	Plántulas endurecidas

– Cosecha de las espigas

Las espigas se cosecharon en el momento en que las microsporas se encontraban en estado uninucleado. Para el cultivo de microsporas se utilizaron aquellas espigas cuyas anteras centrales contenían microsporas en estado uninucleado tardío o binucleado temprano. Para el cultivo de anteras se utilizaron espigas cuyas anteras centrales contenían microsporas en estado uninucleado medio o tardío.

La forma de comprobar el estadio de desarrollo en el que se encontraban las microsporas se realizó mediante la visualización de estas bajo un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse T300 con luz ultravioleta (330-380 nm). La preparación de la muestra consistió en la extracción de las anteras centrales de varias espigas y su colocación sobre una gota de manitol 0.3M en un portaobjetos. Se cortaron con bisturí permitiendo que salieran las microsporas a la solución. Se añadieron aproximadamente 10 µl de la solución stock de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato), preparada previamente en agua destilada a razón de 4 µg de DAPI/ml y conservada a -20°C, y se tapó con un cubreobjetos.

Para facilitar el protocolo se asoció el estado de desarrollo de las microsporas con la longitud existente entre el extremo superior de la espiga y la base de la hoja bandera (Figura 3.1)



Figura 3.1.- Espigas de trigo de la variedad Chris en diferentes estadios. (a) Espiga con microsporas en estado uninucleado temprano-medio, (b) espiga con microsporas en estado uninucleado medio-tardío y (c) espiga con microsporas en estado uninucleado tardío-binucleado temprano. Adaptado de Soriano Castan (2008)

– Pretratamiento

Las espigas se limpiaron superficialmente con etanol 70% y se extrajeron las anteras. Se sembraron 30 anteras por espiga (cinco flores de cada lado) en placas Petri de seis cm de diámetro con medio de pretratamiento (Pág.54), sellándose éstas con Parafilm. Se mantuvieron en este medio durante 4 días en oscuridad en una cámara a 24°C.



Figura 3.2 Anteras de cebada en medio de pretratamiento.

– Inducción de la embriogénesis

Las anteras que presentaron un aspecto engrosado y blanquecino al final del cuarto día de pretratamiento se consideraron óptimas para su transferencia al medio de inducción de embriogénesis (Pág.54). Este medio fue dispensado en placas de 3cm de diámetro en el que se incluyeron como máximo 20 anteras. Las placas fueron selladas con parafilm permaneciendo en las mismas condiciones que en el paso anterior alrededor de diez días. Aquellas placas en las que se observaron microsporas en división se rellenaron con medio de inducción de más alta viscosidad (FHG-Ficoll400) para evitar su hundimiento en el medio, favorecer una buena aireación y renovar nutrientes.

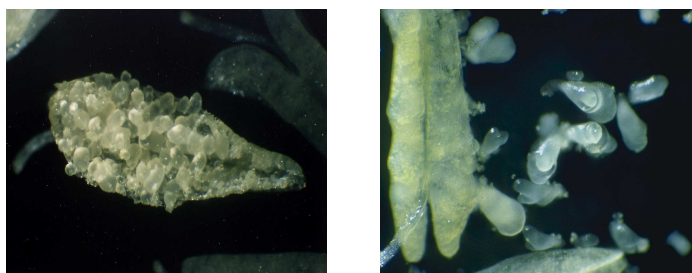


Figura 3.3 Medio de inducción de la embriogénesis de microsporas de cebada. A. Anteras repleta de embriones. B. Medio con anteras y embriones flotando en el medio líquido.

– Regeneración

Al cabo de una semana se revisaron las placas de inducción, trasladando los embriones maduros a medio de regeneración (Pág.56) en el que se formaron las radículas y el tallo. Los dos primeros días se dejaron en las condiciones anteriores para aclimatar los embriones al nuevo medio sin provocarles un estrés mayor. Posteriormente se pasaron a una cámara de crecimiento con condiciones de temperatura de 24°C con ciclos de luz/oscuridad de 16h/ 8h. a 30–40 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-2}$ y humedad del 70%.

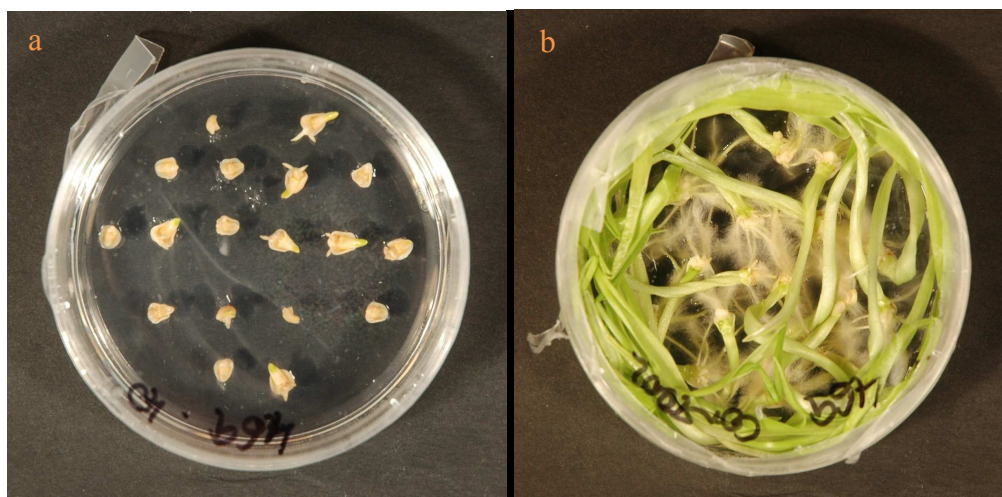


Figura 3.4 Medio de regeneración de embriones de cebada. (a). embriones después de dos días de siembra. (b). plántulas regeneradas de 20 días.

– Enraizamiento

Las plántulas regenerantes verdes fueron trasferidas a cajas Magenta con medio de enraizamiento (Pág.57) manteniéndolas en una cámara a 4°C con un fotoperiodo de 8h de luz para su vernalización durante un mes.



Figura 3.5 Medio de enraizamiento de plántulas de cebada

– Traslado a maceta

Después de un mes las plántulas con raíces se transfirieron a una mezcla de turba: arena : perlita 1:1:1 en una cámara de crecimiento con 90% de humedad y 12h de luz en la que permanecieron 15 días para su endurecimiento. Luego se trasladaron a invernadero para espigado y cosecha.

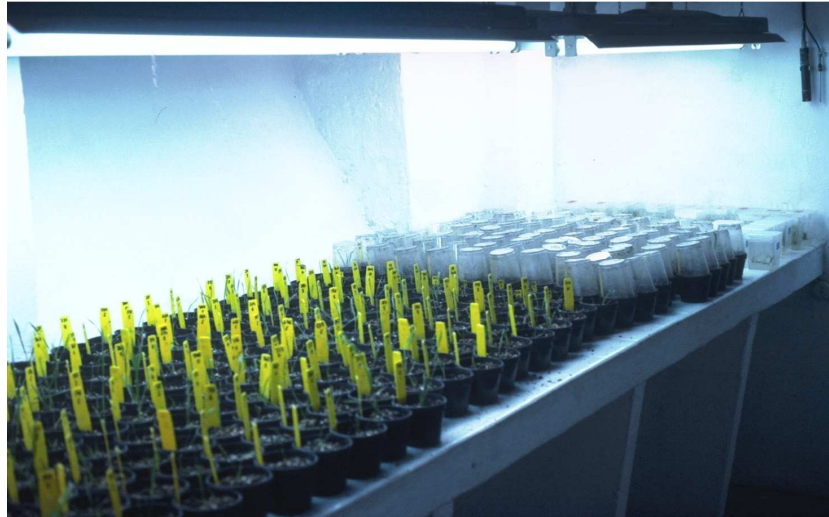


Figura 3.6 Plántulas doblehaploides de cebada trasladadas a maceta.

3.3.4. Cultivo de microsporas

La diferencia con el cultivo de anteras radica en que se realiza una siembra directa de las microsporas pretratadas en vez de traspasar las anteras enteras al medio de inducción. El proceso se resume en la Tabla 3.8.

Tabla 3.8 Resumen de las fases del cultivo de microsporas

FASE	PROCESO	OBTENCION DE
1.Cosecha de espigas	Recolección de espigas y extracción de anteras	Anteras estériles
2.Pretratamiento de anteras	Siembra de las anteras en medio de pretratamiento para inducir reprogramación de las microsporas	Anteras con microsporas viables reprogramadas
3.Aislamiento de microsporas	Homogenización del material para rescatar únicamente las microsporas	Microsporas viables reprogramadas
4.Inducción de embriogénesis en las microsporas viables	Siembra de las microsporas en medio de inducción para inducir la embriogénesis de éstas.	Embriones y callos
5.Regeración de los embriones obtenidos	Repicado en medio de regeneración de los embriones obtenidos	Plántulas
6. Enraizamiento	Repicado de las plántulas en medio de enraizamiento en cajas Magenta	Plántulas enraizadas
7.Traslado a maceta	Cultivo de plántulas enraizadas en maceta	Plántulas endurecidas

El proceso de aislamiento de las microsporas consiste en:

– **Homogenización del material:**

Las anteras pretratadas se suspendieron en una solución 0,3 M de manitol que se introdujo en un homogenizador manual. El homogeneizado obtenido se pasó por un filtro con tamaño de poro de 100 μm a un tubo Falcon de 15ml, con lo que se retienen los restos en la malla y obtenemos una suspensión de microsporas.

– **Recolección de microsporas viables:**

Se centrifugó a 1000 r.p.m. durante cinco minutos y se recogió el precipitado en el que habían quedado las microsporas. El sedimento se resuspendió en 1 ml de manitol 0,3 M. Esta suspensión se pasó a la superficie de una solución de maltosa 20% en otro tubo Falcon, con cuidado de no mezclar ambas fases, y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Como resultado se obtuvieron tres fases líquidas (de la superficie hacia la base: manitol, microsporas, maltosa) y un precipitado con microsporas muertas y restos celulares. La fase intermedia se traspasó a un tubo Falcon con 10ml de manitol 0,3 M que se centrifugó en las condiciones anteriores para lavar las posibles trazas de maltosa que pudiesen quedar.

– **Inoculación:**

Finalmente se obtuvo un precipitado de microsporas viables que se resuspendió con medio de inducción FHG. Después de cuantificar el número de microsporas mediante una cámara Neubauer se transfirió en el volumen apropiado a las placas Petri sobre medio de inducción FHG-Ficoll (Cistué et al., 1995).



Figura 3.7 Medio de inducción de la embriogénesis de cebada con numerosos embriones y callos generados a partir de las microsporas.

Los pasos posteriores son idénticos a los de un cultivo de anteras: Los embriones obtenidos se trasladan a medio de regeneración, de aquí las plántulas que hayan regenerado se trasladan a caja magenta con medio de enraizamiento y luego a maceta.

3.3.5. Variables medidas para el cultivo de anteras y microsporas

Se analizaron las variables:

- Número de anteras sembradas.
- Número de divisiones totales: se calculó sumando el número de callos y de embriones de cada placa. El número de callos se calculó haciendo un recuento sobre

papel milimetrado, de los callos que había en el 10% de la superficie de la placa Petri. Los embriones fueron rescatados de cada placa y contabilizados en el momento.

- Porcentaje de embriones: embriones obtenidos por cada 100 divisiones.
- Porcentaje de plantas albinas: plantas albinas por cada 100 plantas totales.
- Porcentaje plantas verdes: plantas verdes por cada 100 plantas totales.
- Número de plantas verdes y número de plantas albinas regeneradas por cada 100 anteras sembradas.

3.4. CULTIVO DE EMBRIONES CIGÓTICOS INMADUROS

3.4.1. Condiciones de las plantas donantes y cosecha de las espigas:

Las condiciones de crecimiento de las plantas donantes fueron las descritas en el apartado 3.2. En el momento en que se produjo la antesis se marcaron las espigas con la fecha. La cosecha de las espigas se realizó a los 15 DPA (días post-antesis) que corresponde con el grado de desarrollo 11.1/11.2 de la escala de Feekes (Large, 1954).

3.4.2. Esterilización de granos inmaduros:

Las espigas fueron desgranadas manualmente. La esterilización de los granos se llevó a cabo mediante la inmersión de éstos, en:

- Etanol 70 %, un minuto.
- Lejía comercial 25 %, 15 minutos.
- Agua destilada, tres minutos, tres veces.

Una vez esterilizadas las cariósides se rescataron los embriones mediante extracción con escalpelo y fueron sembrados en el medio de regeneración.

3.5. SELECCIÓN *IN VITRO* DE LA POBLACIÓN DH SAHARA x CLIPPER

3.5.1. Material vegetal.

Embriones inmaduros de los cultivares: Sahara, Clipper, Albacete, Igri y líneas DH de la población Sahara x Clipper.

3.5.2. Determinación de la concentración de cribado.

La determinación de la concentración de cribado se realizó sobre embriones cigóticos inmaduros. Se estimó la resistencia máxima de cada genotipo probando concentraciones crecientes de boro.

Como medio control se usó medio FHG de regeneración, que contiene 0,10 mM de boro. Para los tratamientos se utilizó medio FHG de regeneración al que, además de los 0,10 mM de boro, se le añadieron 10, 20, 30, y 40 mM de boro.

El medio de regeneración se dispuso en placas Petri de seis cm de diámetro donde se sembraron un total de 18 embriones por placa provenientes de 6 espigas, realizando tres réplicas por tratamiento. Las condiciones de la cámara fueron idénticas a las utilizadas en la regeneración de embriones de cultivo de anteras.

3.5.3. Caracteres estudiados

Los resultados se tomaron a los 21 días de cultivo, tomando los datos de las variables:

- Número de regenerantes (NReg): embriones que presentaron capacidad organogenica
- Número de regenerantes reales (NRReal): embriones que regeneraron en plántulas con un tamaño superior a 3 cm.
- Longitud total de la plántula (LT)
- Longitud del tallo (LTa)
- Longitud de la raíz (LR)
- El peso total

Además se observó a los 30 días de cultivo en caja Magenta:

- La capacidad de recuperación de las plántulas en medio de enraizamiento libre de boro después de haber estado expuestas a boro
- Los efectos perjudiciales que se producen en el desarrollo de las plántulas en medio de enraizamiento con una concentración de 10 mM de boro.

3.5.4. Determinación *in vitro* de la tolerancia a Boro de las líneas DH de Sahara x Clipper

121 líneas DH de la F1 de Sahara x Clipper obtenidas en cultivo de anteras y microsporas se sembraron en tres series:

La primera serie se sembró en la cámara con un total de 28 líneas DH y parentales. La segunda en invernadero con un total de 93 líneas DH y parentales y los cultivares Albacete, Igri y Plaisant.

Los embriones inmaduros cigóticos obtenidos de cada línea fueron testados en medio de regeneración con boro a una concentración de 30 mM y 40 mM, tomando como control el medio de regeneración FHG. Se realizaron tres réplicas siguiendo el esquema de trabajo del apartado anterior.

Los resultados se tomaron a los 15 días de cultivo, contando el número de regenerantes, el número de regenerantes reales (aquellos con más de 3 cm de longitud) y midiendo longitud total de la plántula, del tallo, de la raíz.

3.6. CARACTERIZACIÓN DE LA RESISTENCIA/SUSCEPTIBILIDAD AL EXCESO DE BORO DE LA POBLACIÓN DH SAHARA x CLIPPER.

La determinación de tolerancia/susceptibilidad de los diferentes materiales se realizó bajo condiciones controladas en invernadero. Se comparó la sintomatología presentada en dos casos: riego normal y riego con una concentración tóxica de boro en el agua.

La adecuada concentración de boro se determinó mediante un pequeño ensayo con los parentales, aplicándoles concentraciones de boro de 100, 200 y 300 mg/L. El método utilizado para este ensayo fue idéntico al que se empleó con toda la población, y que se describe a continuación.

3.6.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento de las plantas

El fenotipado de las 113 líneas DH Sahara x Clipper así como el de los parentales y los cultivares Igri, Albacete, Plaisant y Steptoe, se realizó en invernadero en dos repeticiones.

Para cada repetición se sembraron cuatro semillas de cada línea, dos semillas por maceta, una destinada al control y la otra a tratamiento con boro. Las macetas albergaban sustrato compuesto por arena: perlita: turba (1:1:1). La temperatura se mantuvo a 24°C con un fotoperiodo de 16h de luz.

3.6.2. Protocolo de riego

Las plántulas se comenzaron a regar cuando alcanzaron 1 cm de longitud: las plantas control con 50 ml de agua de riego y las plantas tratamiento con 50 ml de agua de riego con una concentración de boro de 100 mg/L. Esta disolución se preparó diariamente, pudiendo ser utilizada durante dos días. En ambos casos el riego se efectuó en días alternos.

3.6.3. Medición de síntomas.

Se midió el porcentaje de daño foliar tanto de los controles como de las plantas bajo tratamiento de boro a los 15 días, tomando la primera hoja emergida y analizándola con un scanner.

Las imágenes fueron analizadas con el programa “Compu Eye, Leaf & Symptom Area” (Bakr, 2005) (Figura 3.8) para obtener el porcentaje de hoja dañado a partir del área foliar total y el área foliar dañada.

Se establecieron cuatro categorías de daños:

- Tipo I: Zonas amarillentas, secas
- Tipo II: Zonas vivas cloróticas, vivas
- Tipo III: Zonas marrones/gris oscuro, vivas
- Tipo IV: Partes negras, necrosadas

El porcentaje de área foliar dañada de cada tipo se sumó para obtener el porcentaje total de daño.

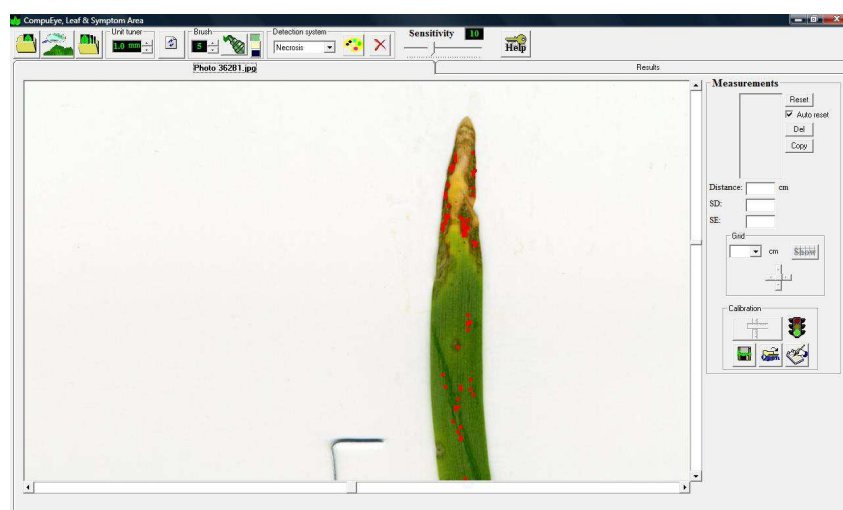


Figura 3.8 Imagen de pantalla del programa “Compu Eye, Leaf & Symptom Area” (Bakr, 2005) para la medición de daño foliar.

3.7. GENOTIPADO DE LA POBLACIÓN DH SAHARA x CLIPPER

3.7.1. Material vegetal

Las 123 líneas DH procedentes del cruzamiento Sahara x Clipper, ambos parentales, y los cultivares Plaisant, Igri, Steptoe y Albacete.

3.7.2. Condiciones de siembra y cosecha

Las semillas se sembraron en invernadero en macetas de 15 cm de diámetro con una mezcla de sustrato consistente en arena: perlita: turba (1:1:1). A las dos semanas de siembra se cortaron dos hojas de cada planta que se utilizaron de manera inmediata para la extracción de DNA.

3.7.3. Preparación de muestras y extracción de DNA

Se pesaron 100 mg de hoja de cada planta y se homogeneizaron manualmente en mortero aplicando nitrógeno líquido. Cada homogeneizado, proveniente de una única planta de cada línea, se transfirió a un tubo Eppendorf que se almacenó en el congelador a temperatura de -80 °C (máximo 24 horas) hasta su uso en el proceso de extracción de DNA.

La extracción de DNA se realizó mediante el kit DNeasy Plant Mini Kit (Quiagen, Valencia, CA, USA). Se obtuvieron concentraciones de DNA genómico de entre 100 y 300 ng/μL.

3.7.4. Marcadores, condiciones de la PCR y electroforesis

La caracterización de los haplotipos, para el carácter de resistencia a toxicidad de boro, para los cultivares especificados y la población de DH Sahar x Clipper se realizó con tres marcadores microsatélites (Karakousis et al., 2003) , descritos en la Tabla 3.9

Tabla 3.9 Descripción de los microsatélites utilizados en el genotipado: localización cromosómica, motivo y tamaño en pares de bases, índice de diversidad (DI) y secuencias cebadoras

SSR	Cromosoma	DI	Repetición	Tamaño	Cebadores
Bmac93	2H	0.81	(AC)24	151	5' CGTTTGGGACGTATCAAT 3' 5' GGGAGTCTTGAGCCTACTG 3'
Bmac67	3H	0.82	(AC)18	171	5' AACGTACGAGCTCTTTTCTA 3' 5' ATGCCAACTGCTTGTTTAG 3'
EBmac679	4H	0.8	(AC)22	148	5' ATTGGAGCGGATTAGGAT 3' 5' CCCTATGTCATGTAGGAGATG 3'

La selección de estos tres microsatélites se realizó estudiando todos los posibles marcadores moleculares disponibles en la bibliografía consultada. Se prefirió el uso de SSR por su facilidad de manejo y su bajo coste tanto económico como de tiempo. Los microsatélites seleccionados son la conversión de RFLP's descritos por Jefferies et al. (1999) que están localizados en el pico de máxima significación de dos QTL's y un gen que determinan diferentes componentes de la resistencia a boro descritos en la Tabla 3.10

En este trabajo he seguido la designación cromosómica de la cebada descrita por Linde-Laursen et al. (1997), en la que se recomienda la nomenclatura de acuerdo a la homología con triticeae.

Tabla 3.10. Marcadores utilizados en el genotipado y QTL que determinan.

Cromosoma	RFLP	SSR	Carácter con el que se relaciona y efecto
2HS	xCDO370	EBmac640 GMS3	Sintomatología foliar
3HS	xAWBMA15	Bmag6 Bmag122	Longitud radicular (junto con el marcador del 4H explican una variación fenotípica del 30%)
4HS	xWG114	EBmac679	Todos los caracteres mencionados
6H	xAmy-1(A)		Concentración de boro en tallo, en combinación con el del 4H explica un 50% de la variación total.

Las secuencias de los cebadores y condiciones de amplificación que se siguieron son las descritas por Ramsay et al. (2000). La mezcla de reacción para la PCR se realizó con los productos TaqDNA polymerase kit (Qiagen). El volumen de la mezcla de reacción para la PCR fue de 15µL/muestra, conteniendo:

1x Buffer PCR	1.5 µL
200 µM dNTP	0.3 µL
1x solución Q	3 µL
400 nM Forward primer	0.3 µL
400 nM revers Primer	0.3 µL
0.5 U Taq DNA polimerasa	0.1 µL
H ₂ O	8 µL
40ng DNA genómico	1.5 µL

El programa de PCR empleado fue:

1 ciclo	{	94 °C 3 min
		55 °C 1 min
		72 °C 1 min
30 ciclos	{	94 °C 1 min
		55 °C 1 min
		72 °C 1 min.
1 ciclo		72 °C 5 min.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Peltier “MyGene Series” (LongGene Scientific Instruments Co.)

La determinación de polimorfismo se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa 2.8 %, en cubetas con tampón TBE 1X y aplicando un voltaje de 80 V durante 180 minutos. Para el revelado de los geles se incorporaron 4 µg de bromuro de etidio por cada 250 ml de gel.

La lectura de los geles se realizó en un transiluminador acoplado a cámara con software Kodak.

3.8. SELECCIÓN *IN VITRO* DE LA POBLACIÓN DH CHEVRON x PI383933

3.8.1. Material vegetal

Embriones inmaduros de los cultivares Chevron, PI383933, Legacy y 99 líneas DH de la población Chevron x PI383933.

3.8.2. Determinación de la concentración de cribado.

La determinación de la concentración de cribado se realizó sobre embriones cigóticos inmaduros. Se estimó la resistencia máxima de cada genotipo probando concentraciones crecientes de deoxinivalenol (DON).

El caso control fue medio FHG de regeneración. Los diferentes tratamientos que se testaron consistieron en medio FGH de regeneración al que se le añadieron las siguientes concentraciones de toxina: 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5; 10, y 15 mg DON/L. Denominándolas como se indica en la Tabla 3.11

Tabla 3.11 Nomenclatura de concentraciones usadas en la selección *in vitro*

Nombre	Concentración (mg DON /L)	Concentración (M)
1	0,1	$3,40 \times 10^{-7}$
2	0,5	$1,70 \times 10^{-6}$
3	1	$3,40 \times 10^{-6}$
4	2,4	$0,85 \times 10^{-5}$
5	5	$1,70 \times 10^{-5}$
6	10	$3,40 \times 10^{-5}$
7	15	$5,00 \times 10^{-5}$

El medio de regeneración se dispensó en placas Petri de seis cm de diámetro donde se sembraron un total de 20 embriones por placa provenientes de cinco espigas, realizando tres réplicas por línea.

Las condiciones de la cámara fueron idénticas a las utilizadas en la regeneración de embriones de cultivo de anteras.

3.8.3. Caracteres estudiados:

Los resultados se tomaron a los 21 días de cultivo, tomando los datos de:

- Número de regenerantes (NReg): embriones que presentaron capacidad organogenica
- Número de regenerantes reales (NRReal): embriones que regeneraron en plántulas con un tamaño superior a 3 cm.
- Longitud total de la plántula (LT)
- Longitud del tallo (LTa)
- Longitud de la raíz (LR)
- El peso total

Además se observó la capacidad de recuperación de las plántulas, después de haber estado expuestas a diferentes concentraciones del tóxico, en medio de enraizamiento libre de DON durante un mes.

3.8.4. Determinación *in vitro* de la resistencia a deoxinivalenol de las líneas DH Chevron x PI383933.

104 líneas DH obtenidas de cultivo de anteras y microsporas fueron sembradas en dos series. La serie I que constaba de 68 líneas DH fue sembrada en invernadero, y la serie II con 36 líneas DH, en semillero. Los embriones inmaduros obtenidos de cada línea se sembraron en medio de regeneración con toxina a una concentración de 7,5 mg DON/ L tomando como control medio sin toxina. Se realizaron tres réplicas siguiendo el esquema de trabajo del apartado anterior.

Los resultados se tomaron a los 15 días de cultivo, contando el número de regenerantes, el número de regenerantes reales (aquellos con más de 3 cm de longitud) y midiendo longitud total de la plántula, del tallo, de la raíz.

Paralelamente se analizaron las variables de cultivo de anteras para cada línea DH y se realizó una caracterización morfológica de las distintas líneas midiendo los siguientes parámetros:

- Altura de la planta (Altura)
- Número de cañas (Cañas)
- Longitud de espiga (LEsp)
- Número de flores por espiga (Flores)
- Número de granos por espiga (Granos)

3.9. DETERMINACION DE LA RESISTENCIA TIPO V A FHB DE LA POBLACIÓN DH CHEVRON x PI383933

Se determinó la resistencia/susceptibilidad de las líneas DH de Chevron x PI383933 siguiendo, con pequeñas modificaciones, el protocolo establecido para trigo en el trabajo de Lemmens et al. (2005). En este artículo se concretó el fenotipo de cada genotipo analizado mediante la aplicación directa de DON en las flores y observando posteriormente la presencia o ausencia de blanqueamiento del resto de la espiga que es uno de los daños asociados a la susceptibilidad a este compuesto.

3.9.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento de las plantas

Se fenotiparon 79 líneas DH Chevron x PI383933 y los parentales. Las plantas crecieron en cámara ASL bajo las condiciones especificadas en el apartado 3.2.

3.9.2. Pruebas de determinación de concentración de DON a inocular.

Se inocularon 10 µl de las disoluciones tratamiento 0.625 mg DON/ml, 1.25 mg DON/ml y 2,5 mg DON /ml de disolución con 0.2 % de Tween 20 en cuatro flores en preanthesis de cada espiga, dos espigas por planta de los genotipos parentales. A las 24 h se repitió la operación sobre las mismas flores, por tanto en conjunto se inocularon 20 µL de DON. La toxina se aplicó con una jeringuilla entre la pálea y la lemma. Para evitar desecación y la entrada de patógenos en la flor se encapucharon las espigas tratadas con una bolsa de celofán.

Para el tratamiento control se inoculó agua destilada estéril con 0.2 % de Tween20.

A los 12 días de la inoculación se tomaron dos parámetros: color y porcentaje de esterilidad.

- Se cuantificó el color de los síntomas estableciendo seis categorías:
1= verde normal
2= menos de la mitad es blanca
3= la mitad de la flor es blanca
4= más de la mitad es blanca
5= blanqueamiento total
6= aparición de mancha marrón.

- Se comprobó el número de flores estériles en cada planta. A partir de él se determinó el porcentaje de esterilidad causada por el tratamiento.

3.9.3. Inoculación del tratamiento de DON sobre la población DH

Se siguió el protocolo del apartado anterior aplicando la concentración de 1.25 mg de DON /ml como tratamiento y agua destilada estéril con 0.2 % de Tween 20 para el control.

Se tomaron las mismas variables que en el apartado anterior.

3.10. GENOTIPADO DE LA POBLACIÓN DH CHEVRON x PI383933

3.10.1. Material vegetal

129 individuos de la población de DH de Chevron x PI383933, Chevron y PI383933.

3.10.2. Condiciones de siembra y cosecha

Las semillas se sembraron en invernadero en macetas de 10 cm de diámetro con una mezcla de sustrato consistente en arena: perlita: turba (1: 1: 1). A las dos semanas de siembra se cortaron dos hojas de cada planta que se utilizaron de manera inmediata para la extracción de DNA.

3.10.3. Preparación de muestras y extracción de DNA

Se pesaron 100 mg de material vegetal de cada planta y se homogeneizaron manualmente en mortero aplicando nitrógeno líquido. Cada homogeneizado se transfirió a un tubo Eppendorf que se almacenó en el congelador a temperatura de -80 °C (máximo 24 horas) hasta su uso en el proceso de extracción de DNA.

La extracción de DNA se realizó mediante el kit DNeasy Plant Mini Kit (Quiagen, Valencia, CA, USA). Se obtuvieron concentraciones de DNA genómico de entre 100 y 300 ng/μL.

3.10.4. Marcadores SSR, condiciones de la PCR y electroforesis

La caracterización de los haplotipos para el carácter de resistencia a toxicidad de DON para los cultivares especificados y la población de DH Chevron x PI se realizó con marcadores microsatélites descritos en la Tabla 3.12.

La selección de estos microsatélites se realizó estudiando todos los posibles marcadores moleculares disponibles en la literatura. Se prefirió el uso de SSR por su facilidad de manejo y su bajo coste tanto económico como de tiempo. Los microsatélites seleccionados están localizados en el pico de máxima significancia de dos QTL's que determinan diferentes componentes de la resistencia a FHB descritos en la Tabla 3.12

En este trabajo se ha seguido la designación cromosómica de la cebada descrita por Linde-Laursen et al. (1997), en la que se recomienda la nomenclatura de acuerdo a la homología con triticeae.

Tabla 3.12 Marcadores asociados a QTL's de diferentes componentes de resistencia a FHB, y poblaciones donde se encontraron.

Crom	Marcador	Población	Relacionado con
1H		Chevron/Stander	
	HVM20	Fredrickson/ Stander	FHB, Dias de espigado, Altura.
	Bmac90	Fredrickson/ Stander	FHB
	Bmag770	Fredrickson/ Stander	Marcador flanqueante
	Bmag105	Zhedar/ND9712//Foster	Marcador flanqueante
	Bmag382	Zhedar/ND9712//Foster	FHB
2H	HVM36	Fredrickson/ Stander	FHB, Contenido carbohidratos, Potencial hídrico foliar.
		Stander/MNS93	DON
	EBmac850	Zhedar/ND9712//Foster	FHB
	EBmac615	Fredrickson/ Stander	FHB
	EBmac557	Fredrickson/ Stander	FHB
		Stander/MNS93	DON
	Bmac93	Fredrickson/ Stander	FHB
		Chevron/M69	DON.
		Stander/MNS93	DON, KD (Kernel Discoloration)
		M92-299/M81	DON, KD
		Nueve poblaciones de mejora	
	Bmac140	Fredrickson/ Stander	FHB
		CIho4196/Foster	DON
		Nueve poblaciones de mejora	
	EBmac521	Zhedar/ND9712//Foster	FHB
	a	Fredrickson/ Stander	FHB
	b	Chevron/M69	DON
	b	Stander/MNS93	KD, DON
	a	M92-299/M81	DON, KD
	c	Nueve poblaciones de mejora	
	Bmag378	Zhedar/ND9712//Foster	FHB,DH, Peso de grano
	Ebm415	Fredrickson/ Stander	FHB, HD, rendimiento en grano, DON
		Chevron/Stander	
		Nueve poblaciones de mejora	
	HVM54	Fredrickson/ Stander	FHB, HD, Peso de grano, rendimiento en grano
		Nueve poblaciones de mejora	

Continúa

Continuación

	Bmag125	Fredrickson/ Stander M92-299/M81 Nueve poblaciones de mejora	DON, FHB, , Contenido carbohidratos DON, KD
	Ebmac0558	M92-299/M81 Chevron/M69	DON KD
	HVM23	Chevron/M69	KD
3H	Bmac67 Bmag905	Fredrickson/ Stander Fredrickson/ Stander Nueve poblaciones de mejora	FHB Marcador flanqueante
	Bmag606 Bmag13 Bmag225	Fredrickson/ Stander Fredrickson/ Stander Zhedar/ND9712//Foster Fredrickson/ Stander Chevron/M69 M92-299/M81 Stander/MNS93	FHB FHB, Potencial hídrico foliar Marcador flanqueante Not related to FHB DON
	BARC69 ABG004 Bmag209 Bmag0138	Zhedar/ND9712//Foster Gobernadora/CMB643 Nueve poblaciones de mejora Nueve poblaciones de mejora	FHB resistencia tipoII
4H	Bmag0106	CIho4196/Foster	DON
5H	Bmac306 Bmag0770 Bmag0345 Bmag0347	Fredrickson/ Stander Nueve poblaciones de mejora Nueve poblaciones de mejora Nueve poblaciones de mejora	Marcador flanqueante
6H	Bmag173 Bmac18 Bmag870 Bmac251 Bmag001 Bmag003c Bmac0040 Bmag500	Zhedar/ND9712//Foster Fredrickson/ Stander M92-299/M81 Chevron/M69 Fredrickson/ Stander Fredrickson/ Stander M92-299/M81 Zhedar/ND9712//Foster Fredrickson/ Stander Chevron/M69 M92-299/M81 Chevron/M69 Chevron/M69	Marcador flanqueante FHB KD KD FHB Marcador flanqueante KD FHB Not related to FHB KD KD DON KD

Continúa

Continuación

	Bmag613	M92-299/M81	
	Bmag807	M92-299/M81	KD
		Chevron/M69	KD
	GMS06	Stander/MNS93	KD
7H	Bmag110	Fredrickson/ Stander	Marcador flanqueante
		Zhedar/ND9712//Foster	Not related to FHB
	Bmag206	Fredrickson/ Stander	Marcador flanqueante DON
		Chevron/M69	KD
	Bmac64	Fredrickson/ Stander	FHB, Altura, dias de espigado,
			absorción de agua por semilla
	HVM04	Chevron/M69	KD

Las secuencias de los cebadores y condiciones de amplificación que se siguieron son las descritas por Ramsay et al. (2000). En algunos casos se realizaron modificaciones, que aparecen descritas en la Tabla 3.13.

Tabla 3.13 Condiciones de amplificación de los diferentes marcadores.

Tipos de PCR y marcadores de cada categoría						
PCR1	PCR2	PCR3	PCR4	PCR5	PCR6	No conocida
HVM20	Bmag382	Bmag770	Bmag105	EBmac850	HVM04	BARC69
HVM36	Bmag378	Bmag905	EBmac615	EBmac557		ABG004
HVM54	Ebmac0558	Bmag0770	Bmac93	Bmac18		Bmag209
HVM23	Bmag13	Bmag870	EBmac521			Bmag0106
	Bmag225	Bmag807	Ebmac415			Bmag001
	Bmag0138		Bmag125			Bmag003c
	Bmac306		Bmac67			
	Bmag0345		Bmag606			
	Bmag173		Bmag0347			
	Bmac251		Bmag613			
	Bmac0040		GMS06			
	Bmag500					
	Bmag110					
	Bmag206					
	Bmac64					
	Bmac90					
	Bmac140					
Condiciones						
PCR1	48 ciclos de: desnaturalización a 94°C, 1 minuto y para la extensión 72°C 1 minuto. La temperatura de unión fue disminuyéndose progresivamente en 1°C cada ciclo durante los primeros ciclos, desde 64°C a 55°C (30 s), en los 30 ciclos siguientes se mantuvo a 55°C 1 minuto. La reacción finalizó con 5 minutos a 72°C.					
PCR2	1 ciclo de: 3 minutos a 94°C, 1 minuto a 58°C, 1 minutos a 72°C 30 ciclos de: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C, 30 segundos a 72°C, 1 ciclo de: 5 minutos a 72°C.					
PCR3	3 minutos 94°C, 45 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C, 2 minutos a 72°C, extensión final de 10 minutos a 72°C.					

Continúa

Continuación

PCR4	1 ciclo de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C, 1 minuto a 72°C, 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C, 1 minuto a 72°C, 1 ciclo de 5 minutos a 72°C
PCR5	1 ciclo de 3 minutos a 94°C, 1 minuto a 66°C, 1 minuto a 72°C, 5 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 65°C (disminución de 1°C por ciclo), 30 segundos a 72°C, 24 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C, 30 segundos a 72°C, 1 ciclo de 5 minutos a 72°C.
PCR6	Un ciclo de 94°C 3 minutos, 55°C r 2 minutos, and 72°C 1.5 minutos, 30 ciclos de 94°C 1 minutos, 55°C 2 minutos, and 72°C 1.5 minutos.

La mezcla de reacción para la PCR se realizó con los productos TaqDNA polymerase kit (Qiagen). El volumen de la mezcla de reacción para la PCR fue de 15µL/muestra, conteniendo:

<i>1x Buffer PCR</i>	<i>1.5 µL</i>
<i>200 µM dNTP</i>	<i>0.3 µL</i>
<i>1x solución Q</i>	<i>3 µL</i>
<i>400 nM Forward primer</i>	<i>0.3 µL</i>
<i>400 nM Revers Primer</i>	<i>0.3 µL</i>
<i>0.5U Taq DNA polimerasa</i>	<i>0.1 µL</i>
<i>H₂O</i>	<i>8 µL</i>
<i>40 ng DNA genómico</i>	<i>1.5 µL</i>

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Peltier “MyGene Series” (LongGene Scientific Instruments Co.)

La determinación de polimorfismo se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa 2.8 %, en cubetas con tampón TBE 1X y aplicando un voltaje de 80 V durante 180 minutos. Para el revelado de los geles se incorporó 4µg de bromuro de etidio por cada 250 ml de gel.

La lectura de los geles realizó en un transiluminador acoplado a cámara con software Kodak.

3.10.5. Marcadores DArT's

En total 92 muestras de DNA de las 129 plantas analizadas con SSR's y de los dos parentales fueron enviadas a Diversity Arrays Technology Pty Ltd (Australia) para la determinación del perfil de DArT's de cada individuo. Las muestras se enviaron bajo las condiciones especificadas por la empresa (<http://www.triticarte.com.au>).

La empresa indica en el informe final:

- “P value”: la calidad del marcador.
- Reproducibilidad del marcador.
- PIC (Polimorphism Information Content)
- Posición: en que cromosoma y lugar dentro del propio cromosoma.

Se escogieron marcadores DArT porque presentan una serie de ventajas como son: No requiere información sobre las secuencias; alto rendimiento; adquisición rápida de datos y análisis rápido; detecta cambios de una sola base así como inserciones o deleciones; detecta diferencias en la metilación del ADN; según el enzima usado para

generar los fragmentos; genera clones listos para secuencias; requiere muestras pequeñas de ADN; buena transferencia de marcadores entre poblaciones de mejoramiento y puede automatizarse totalmente

Como desventajas se destacan dos: Tiene requisitos técnicos considerables y los marcadores son dominantes. Este último aspecto no es de importancia en este trabajo, ya que se utilizó una población DH.

3.10.6. Construcción del mapa de ligamiento

El análisis de ligamiento se llevó a cabo con el software Joinmap®4.0 (Van Ooijen, 2006) utilizando el parámetro “Independence LOD” y teniendo en cuenta un valor mínimo de selección de grupos de LOD = 4. El cálculo de distancias y el orden relativo de los marcadores en cada grupo se realizó por regresión con la función de mapa Haldane y con el algoritmo de máxima verosimilitud (ML).

Previo a la construcción del mapa de ligamiento se excluyeron marcadores que resultaban poco informativos o engañosos. Los marcadores con un “P value” menor de 80 (que nos indica la calidad del marcador) y aquellos que presentaban una desviación de la segregación esperada, cálculo realizado mediante un test chi-cuadrado, fueron descartados.

Para la construcción del mapa de ligamiento se crearon los grupos de ligamiento únicamente con los marcadores de posición conocida, se realizaron varias rondas de control del valor-SCL, se crearon nuevos mapas, se volvieron a limpiar marcadores que no cuadraban bien, se calculó el mapa y por último se comparó con el mapa consenso. Posteriormente, en una segunda ronda, se añadieron el resto de DArT's, y en una tercera ronda los SSR.

Los nombres de los grupos fueron asignados de acuerdo a las referencias de marcadores en cada cromosoma. Los mapas de ligamiento que cayeron en un mismo cromosoma se denominaron por orden alfabético.

3.10.7. Búsqueda de QTL's

El análisis de QTL se llevó a cabo mediante el programa de uso libre Windows QTL Cartographer 2.5 (Wang et al., 2012).

Para la búsqueda de QTL's se utilizó el procedimiento de mapeo por intervalos compuesto (CIM=Composite Interval Mapping), estableciendo un análisis automático de identificación de los cofactores para cada carácter mediante “*forward selection backward elimination stepwise regresión*”. Los valores de LOD que se utilizaron para declarar un QTL como significativo fueron determinados por el propio programa, para lo que establecimos su estimación en base a 1000 permutaciones, con una ventana de escaneo (“*window scan*”) de 10 cM, y un error permitido del tipo I de hasta el 5 %.

Para la determinación de posibles QTL's a partir de los datos categóricos (color en el ensayo de fenotipado) se utilizó el método de análisis de datos categóricos que incluye el programa, estableciendo una selección mediante mapeo por intervalos (*Interval Mapping*). El valor de LOD que se utilizó para declarar un QTL como significativo fueron determinados por el propio programa, para lo que establecimos su estimación en base a 1000 permutaciones, con una ventana de escaneo (*window scan*) de 10 cM, y un error permitido del tipo I de hasta el 5 %.

Como datos fenotípicos se utilizaron los valores medios de cada replica de cada serie de cada ensayo. Cada serie se ha considerado como un ambiente diferente. En total se buscaron QTL's para los caracteres de:

Selección *in vitro*: para las Series I y II se examinaron:

- Número de regenerantes (NReg)
- Número de regenerantes reales (NRReal)
- Longitud total de la plántula (LT)
- Longitud del tallo (LTa)
- Longitud de la raíz (LR)

Caracteres morfológicos: también para ambas series

- Altura de la planta (Altura)
- Número de cañas (Cañas)
- Longitud de espiga (LEsp)
- Número de flores por espiga (Flores)
- Número de granos por espiga (Granos)

Fenotipado con inoculación de DON. Solo se llevó a cabo una serie para este ensayo, por tanto se utilizaron los valores medios de las repeticiones dentro del ensayo.

- Color
- Porcentaje de Esterilidad (esterilidad)

La representación gráfica de los grupos de ligamiento y los QTL se realizó con el software Map Chart (Voorrips, 2002).

3.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa GensStat® 7th Edition (Payne et al., 2003). Los análisis realizados se encuentran detallados en cada apartado.

De modo general el diseño experimental consistió en bloques completos al azar.

En los ensayos de seleccion *in vitro*, se tomó como unidad experimental la placa de cultivo. Cada placa presentó embiones o plantas procedentes del mismo ambiente. Cada bloque correspondió con las repeticiones dentro del mismo ensayo, es decir, tres placas.

En los ensayos de determinación de resistencia o susceptibilidad en inverandero se tomaron como unidades experimentales o bien la hoja, para la tolerancia a boro, o el grano para comprobar la resistencia a DON. Cada bloque correspondió con las repeticiones dentro del mismo ensayo, es decir, cuatro hojas u ocho flores, respectivamente.

Se analizó la normalidad de los resultados mediante el comando de “probably distribution plot” del programa, realizando gráficos Q-Q. Los análisis de varianza se realizaron mediante el procedimiento “General Analisis of Variance” o bien mediante el método “RELM” (residual maximum likelihood), en caso de diseño no balanceado.

Las separaciones de medias se analizaron mediante el test de Duncan ($p < 0.5$)

4. RESULTADOS

RESULTADOS

4.1. PRODUCCIÓN DE LA POBLACIÓN DE DH SAHARA x CLIPPER

La producción de DH a partir de los métodos de androgénesis descritos dio como resultado la obtención de dos poblaciones que definiremos por la dirección del cruzamiento de los parentales, esto es, Clipper x Sahara (CxS) y Sahara x Clipper (SxC). Quedaron constituidas por un total de 307 y 147 líneas DH respectivamente.

La población SxC se obtuvo únicamente mediante cultivo de anteras. La población de CxS se obtuvo tanto por cultivo de anteras como por cultivo de microsporas, siendo la aportación del primer método de 217 individuos y la del segundo de 90 individuos.

En la Tabla 4.1 podemos observar la respuesta al cultivo de anteras y al cultivo de microsporas de los diferentes genotipos y cruzamientos.

Tabla 4.1 Variables de respuesta al cultivo de anteras y microsporas

Sistema de androgénesis	Población o variedad	Anteras sembradas*	n° divisiones	% embriones	% verdes	% albinas	Plantas verdes / 100 anteras ^a	Plantas albinas / 100 anteras
Cultivo de anteras	SxC	2.370	43.415	7,18	43,12	56,87	23,29	30,71
	CxS	2.520	49.676	5,85	56,49	43,50	34,68	26,87
	Sahara	687	-	-	5,93	94,07	3,50	56,40
	Clipper	785	-	-	90,48	9,52	4,18	0,44
Cultivo microsporas	CxS	1.581	11.376	76,95	56,72	43,27	27,87	22,10
	Sahara	552	2.748	70,93	4,39	95,60	3,1	63,04
	Clipper	2.595	20.149	87,93	87,89	12,10	34,32	4,71

*Anteras sembradas inducidas

^a No todas las plantas regeneradas se llevaron a medio de enraizamiento.

Los primeros datos que se comparan son los de los parentales. Apoyándonos en los datos de la Tabla 4.1 observamos que los parentales, Clipper y Sahara, presentan un comportamiento completamente distinto. Clipper muestra una aptitud muy buena para el cultivo *in vitro* como demuestran los valores de todas las variables, y más en concreto el número de plantas verdes obtenidas en el cultivo de microsporas, un total de 34 por cada 100 anteras sembradas, lo que representa una excelente producción. La producción de plantas DH de Sahara es realmente mala para ambas técnicas androgénicas. Se obtienen tan solo tres plantas verdes por cada 100 anteras sembradas y esto es consecuencia del altísimo porcentaje de producción de plantas albinas que presenta, un problema típico del cultivo de tejidos de cereales. No obstante, la respuesta del resto de variables es aceptable (número de divisiones) e incluso buena (porcentaje de embriones).

El siguiente elemento de análisis son los cruzamientos. Para comparar las posibles diferencias que pudiese haber según la dirección del cruzamiento se produjeron dos poblaciones mediante cultivo de anteras, una para cada dirección. Los resultados para las variables de cultivo de anteras aparecen en la parte superior de la Tabla 4.1. No se

obtuvieron diferencias significativas para ninguno de los parámetros medidos, aunque habría que destacar un mayor tendencia de las poblaciones hacia los valores de la madre utilizada, por ejemplo, en el caso de la población DH SxC se obtienen un porcentaje mínimamente superior de embriones y plantas albinas. Lo mismo sucede con el cultivar Sahara. La población DH CxS se inclina más hacia los valores de Clipper, presentando menor porcentaje de producción de embriones y albinismo, respecto a SxC.

Para poder analizar una posible distorsión de la segregación deberíamos centrarnos en el apartado de cultivo de microsporas de la Tabla 1, en la que vemos los datos de aptitud para cultivo *in vitro* de los cultivares Clipper, Sahara y la población DH CxS. Cabría esperar un comportamiento intermedio de la población respecto al de los parentales, lo que sucede para todas las variables medidas exceptuando el número de embriones, que aparece sesgada hacia los valores de la madre.

Respecto a la eficacia de los sistemas androgénicos utilizados, para poder compararlos tenemos que fijarnos en los resultados de los parentales y los de la población DH CxS. En ambos casos podemos ver que los resultados de porcentaje de plantas verdes y albinas regeneradas para las dos técnicas de cultivo no presentan diferencias aparentes. Sin embargo, en el cultivo de microsporas el porcentaje de embriones es, en general, mayor; y el número de plantas obtenidas por 100 anteras es a la vista de los datos, superior para Clipper, el parental que presenta una buena disposición para el cultivo *in vitro*.

Tabla 4.2 Número de plantas totales y número de carreras.

Técnica androgénesis	Dirección del cruzamiento	Llevadas a caja	2 Carreras	6Carreras	Total (455)
Cultivo de anteras	SxC	307	76	82	148
	CxS	464	238	24	217
Cultivo de microsporas	CxS	154	77	23	90

Además de los parámetros recogidos en la Tabla 4.1, también se recogieron datos del tipo de cebada regenerada según el número de carreras (Tabla 4.2). A pesar de que para los parámetros de cultivo *in vitro* no existía una distorsión de la segregación significativa, observamos una distorsión de la segregación en la población CxS a favor del tipo de dos carreras, cosa que no ocurre en la otra dirección (SxC). Por este motivo se consideró más acertado continuar la población SxC para la consecución del proyecto. De las 148 líneas DH que constituyen la población SxC se conservaron un total de 123, aquellas de las que se pudo multiplicar semillas suficiente como continuar con los estudios de este proyecto.

4.2. PRODUCCIÓN DE LA POBLACIÓN DH CHEVRON x PI383933

Debido a problemas en la adaptación de los genotipos parentales a las condiciones españolas de cultivo, y por tanto para la polinización, solo se pudo realizar el cruzamiento de éstos utilizando el cultivar Chevron como madre y la línea PI383933 como padre, obteniéndose una población F1, Chevron x PI383933.

La producción de la población DH a partir de la F1 Chevron x PI383933 se realizó mediante cultivo de anteras y de microsporas con la aplicación de los sistemas de androgénesis ya descritos. Se consiguieron un total de 188 líneas DH verdes con semilla, lo que constituyó un éxito debido a la poca aptitud para el cultivo *in vitro* de los parentales.

En la Tabla 4.3 podemos observar la respuesta al cultivo de anteras y al cultivo de microsporas de los diferentes genotipos y cruzamientos.

Tabla 4.3 Variables de respuesta al cultivo de anteras.

Sistema de androgénesis	Población	Anteras sembradas	n° divisiones	% embriones	% verdes	% albinas	Plantas verdes / 100 anteras*	Plantas albinas / 100 antera
Cultivo de anteras	Ch x PI	2.130	10.348	17,41	42,58	57,41	27,65	37,27
	Chevron	519	249	11,64	17,39	82,61	2,10	6,66
	PI383933	600	337	8,30	38,46	61,53	2,08	3,33
Cultivo de microsporas	Ch x PI	420	912	30,92	13,23	86,76	4,28	28,09

*No todas las plantas regeneradas se llevaron a medio de enraizamiento.

En el caso de esta población el cultivo de anteras resultó claramente superior al cultivo de microsporas respecto a todos los parámetros medidos, con la única excepción del porcentaje de embriones. Con el cultivo de anteras se obtuvieron un total de 27 plantas verdes por cada 100 anteras sembradas frente a las cuatro que conseguimos mediante el cultivo de microsporas.

Para los parentales vemos que ambos son genotipos recalcitrantes en los que solo se obtienen entre ocho y cinco plantas por cada 100 anteras sembradas, de las que solo dos son plantas verdes. Tampoco tienen un alto porcentaje de producción de embriones.

Llama la atención que los valores para las variables de cultivo *in vitro* de la población, tanto de cultivo de anteras como de microsporas, no concuerdan con la media de los valores de los parentales.

4.3. SELECCIÓN *IN VITRO* DE LA POBLACIÓN DH SAHARA x CLIPPER

4.3.1. Determinación de la concentración de cribado

Antes de la realización de la selección *in vitro* de toda la población se observó la respuesta general de los embriones en el medio de regeneración bajo toxicidad de boro. Se determinó si existían diferencias significativas entre los parentales y se buscó la concentración adecuada para detectarlas. Para conseguirlo se comprobó el crecimiento *in vitro* de embriones inmaduros de la los cultivares Sahara, Clipper, Albacete e Igri en medio de regeneración con cuatro concentraciones crecientes de boro y control (Figura 4.1). Las variables medidas fueron: número de regenerantes por placa; número de

regenerantes reales por placa; longitud total, longitud del tallo y longitud de la raíz de las plántulas regeneradas (Figura 4.2).

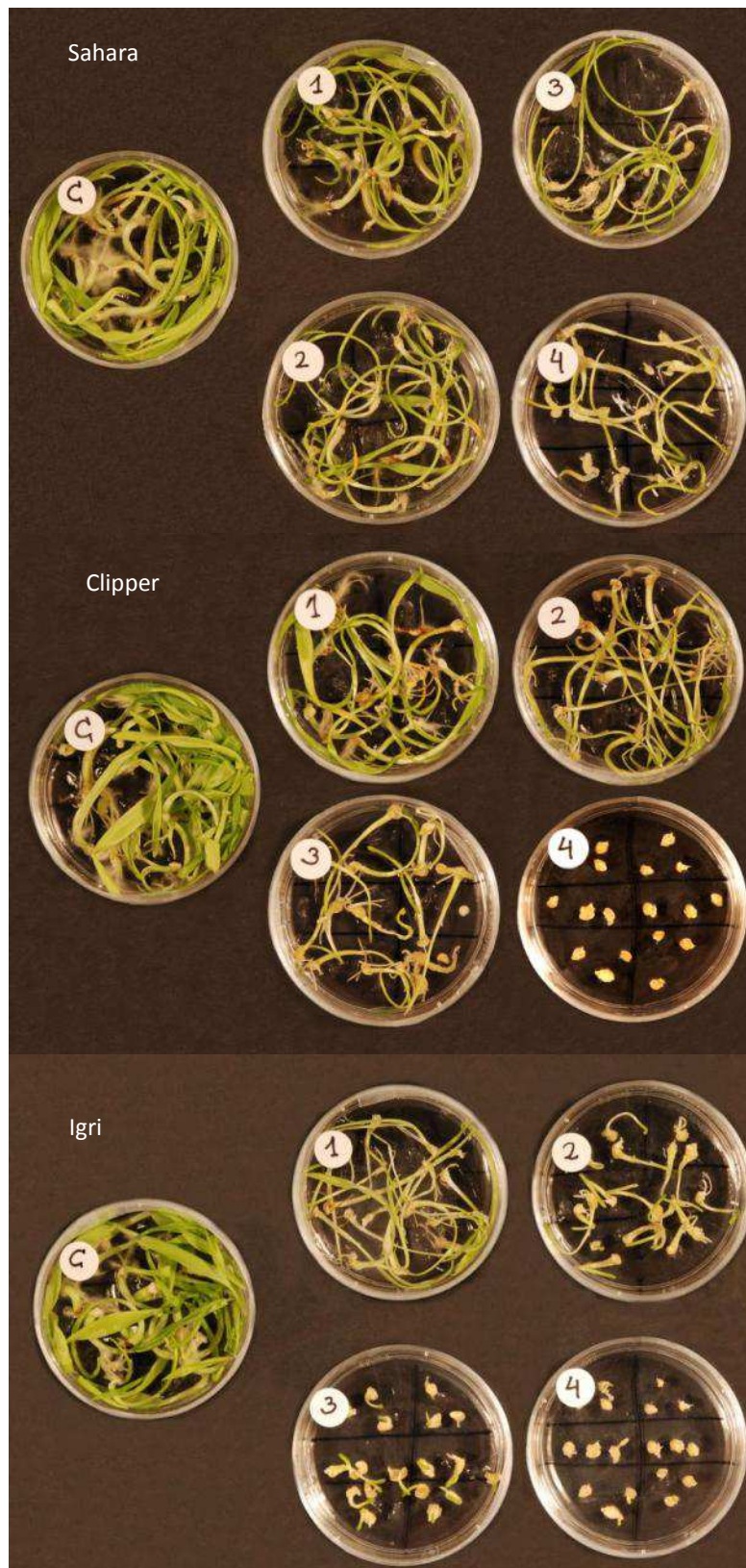


Figura 4.1 Placas de regeneración de embriones de Sahara, Clipper e Igri en las diferentes concentraciones de cribado: C, control. 1, 10mM boro. 2, 20mM boro. 3, 30mM boro. 4, 40mM boro.

Mediante un análisis ANOVA se obtuvieron diferencias significativas para los genotipos, los tratamientos y su interacción ($P < 0.001$). Los datos (Figura 4.2) muestran un efecto inhibitorio en la regeneración y el crecimiento de las plántulas a medida que la concentración de boro aumenta, siendo la concentración de boro 40 mM letal para todos los genotipos con excepción del caso de Sahara. Además, este mismo cultivar presenta un comportamiento peculiar en el crecimiento:

- En el desarrollo de la raíz, donde observamos que hasta la concentración 20 mM la raíz experimenta un gran crecimiento para luego caer drásticamente en la concentración 30 mM y concentración 40 mM.
- En el crecimiento del tallo y la longitud total. Hasta la concentración 20 mM se observa el mantenimiento de las longitudes o un pequeño crecimiento, a partir de aquí decae pero no de manera tan brusca como en el resto de variedades.

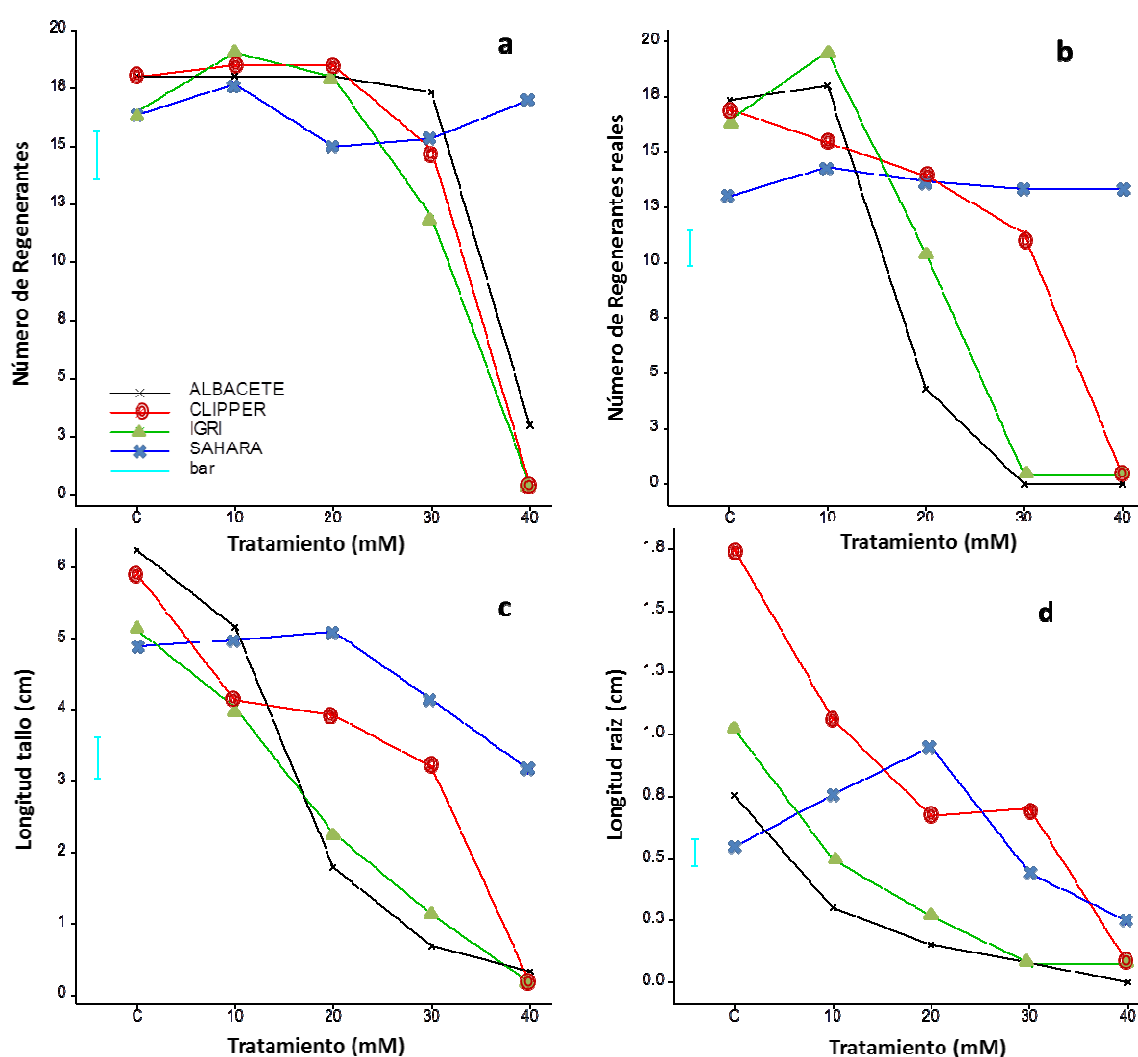


Figura 4.2. Efecto de concentraciones crecientes de boro en: a) el número de regenerantes, b) el número de regenerantes reales, c) longitud del tallo, d) longitud de las raíces.

La diferencia entre los tratamientos aparece descrita mediante separación de medias por Duncan en la Tabla 4.4. La concentración de 40 mM resulta significativamente diferente del resto en todos los casos. La concentración de 30 mM resulta diferente solo para longitud total, en el resto de los casos forma grupos de medias homogéneas con 20 y 40 mM para número de regenerantes reales y longitud del tallo; con el control, 10 y 20 mM para número de regenerantes; con 40 mM para longitud de la raíz.

Tabla 4.4 Medias de cada carácter en cada tratamiento y genotipo: diferencias en la respuesta al tratamiento dentro de cada genotipo

Cultivar	Tratamiento (mM)	NRReal	NR	LT (cm)	LTa (cm)	LR (cm)
Clipper	0	16.93 a	17.97 ab	7.657 a	5.911 a	1.746 a
	10	15.43 a	18.47 a	5.195 b	4.132 a	1.064 b
	20	13.93 b	18.47 ab	4.598 c	3.926 b	0.672 b
	30	11.32 b	14.88 b	3.899 d	3.199 b	0.701 c
	40	0.43 b	0.47 c	0.251 e	0.174 b	0.078 c
Sahara	0	13.00 a	16.33 bc	5.433 c	4.887 a	0.546 a
	10	14.33 a	17.67 c	5.742 b	4.985 a	0.757 b
	20	13.67 b	15.00 bc	6.054 a	5.102 b	0.952 b
	30	13.33 b	15.33 b	4.587 d	4.144 b	0.443 c
	40	13.33 b	17.00 a	3.396 e	3.151 b	0.245 c
Albacete	0	17.33 a	18.00 ab	7.000 a	6.246 a	0.754 a
	10	18.00 a	18.00 a	5.463 b	5.161 a	0.302 b
	20	4.33 b	18.00 ab	1.941 c	1.789 b	0.152 b
	30	0.00 b	17.33 b	0.764 d	0.684 b	0.081 c
	40	0.00 b	3.00 c	0.333 e	0.333 b	0.000 c
Igri	0	16.43 a	16.47 ab	6.148 a	5.125 a	1.023 a
	10	19.53 a	19.03 a	4.531 b	4.035 a	0.498 b
	20	10.43 b	17.97 ab	2.541 c	2.273 b	0.268 b
	30	0.43 b	11.97 b	1.207 d	1.129 b	0.078 c
	40	0.43 b	0.47 c	0.251 e	0.174 b	0.078 c

* Los valores con la misma letra no son diferentes significativamente (P=0.05)

En la Tabla 4.5 aparecen reflejados las comparaciones de medias de cada genotipo para cada uno de los caracteres medidos, es decir la diferencia entre genotipos. Se obtuvieron diferencias significativas entre Clipper y Sahara para todas las variables excepto número de regenerantes. Igri y Albacete son diferentes al resto en número de regenerantes reales y longitud de la raíz; son iguales entre sí y diferentes al resto en la longitud del tallo y la total; e iguales a Clipper en número de regenerantes.

Tabla 4.5 Diferencias de medias entre los genotipos para cada carácter.

Genotipo	Carácter									
	NR (nº)		NRReal (nº)		LT (cm)	LTa (cm)	LR (cm)			
Igri	13.18	b	7.93	d	2.93	c	2.54	c	0.25	d
Albacete	14.05	b	9.45	c	3.10	b	2.84	b	0.38	c
Clipper	14.87	ab	11.61	b	4.32	a	3.46	a	0.58	b
Sahara	16.27	a	13.53	a	5.04	a	4.45	a	0.85	a

Además de la regeneración en placa otro de los cuellos de botella que se presenta en la producción de plantas en cultivo *in vitro* es el enraizamiento. Para comprobar que la capacidad de recuperación de las plántulas sometidas a estrés con boro no se había visto afectada una vez libres de la presión selectiva, y que por tanto podrían continuar su desarrollo normal y llegar a dar semilla, se transfirieron a medio de enraizamiento (Figura 4.3). En el caso de Sahara se transfirieron las plantas control y las de las cuatro concentraciones de cribado. Para Clipper no se transfirió la concentración 4 ya que no hubo plantas regenerantes.

También se observó el efecto perjudicial que podría producir el boro en el desarrollo de las plántulas. Para ello se transfirieron los distintos regenerantes a medio de enraizamiento con una concentración de 10 mM de boro (Figura 4.3). Se utilizó esta concentración ya que es la más común para estudios de tolerancia en plántulas. Comparando las fotografías de la Figura 4.3 vemos como los síntomas de toxicidad en Clipper son más acusados que en Sahara. Estos síntomas son: clorosis de las hojas y en casos severos necrosado, alargamiento y disminución del área foliar, y fallo en la regeneración.

Observando la Figura 4.3 a y c, se comprueba que la exposición a boro ha mermado la capacidad de recuperación de las plántulas en cualquiera de las concentraciones, siendo más intenso el efecto en las concentraciones más altas donde el enraizamiento, o bien se ve imposibilitado (Clipper), o disminuido (Sahara). En el caso de Clipper, sólo las plántulas de regeneración 10 mM con medio de enraizamiento normal presentan un crecimiento aceptable para la obtención de semilla. Inclusive las plántulas regeneradas en medio control y trasladadas al medio de enraizamiento con boro presentan una afección fuerte. Para Sahara una concentración de 30 mM permitiría la obtención de semilla incluso en el caso de que se mantuviese la presión de selección en el enraizamiento. Las plantas Sahara regeneradas en medio control que han crecido en medio de enraizamiento con boro no presentan diferencias respecto a las que han crecido en medio control en las dos fases.

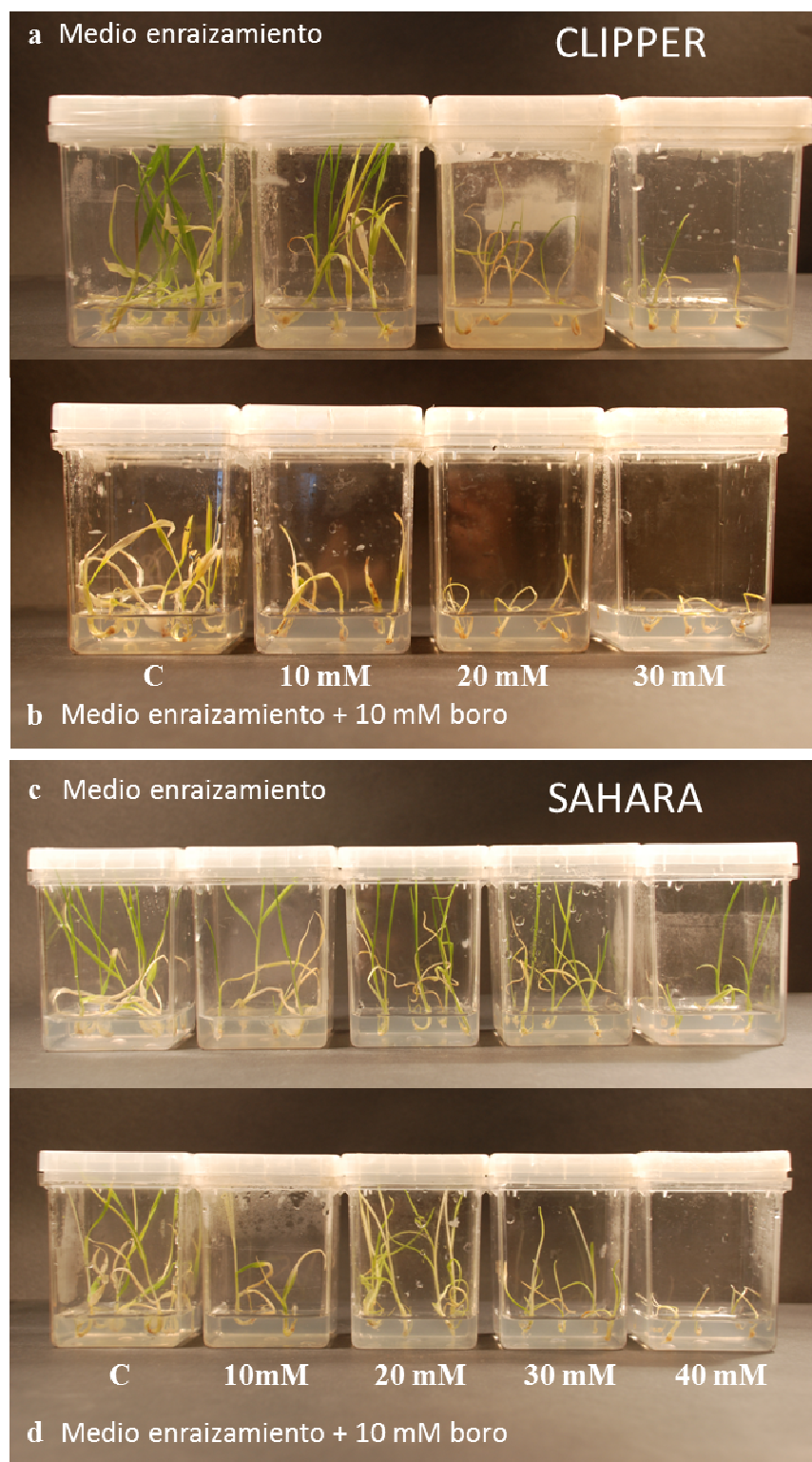


Figura 4.3 Cajas Magenta con medio de enraizamiento (a,c) y con 10 mM boro (b,d). a, b: plántulas de Clipper regeneradas en las diferentes concentraciones testadas de boro (C, 10 mM, 20 mM y 30 mM). c, d: plántulas de Sahara regeneradas en las diferentes concentraciones testadas de boro (C, 10 mM, 20 mM, 30 mM y 40 mM).

4.3.2. Selección *in vitro*

4.3.2.1. Resultados de Toxicidad por boro en las de variables cultivo: regenerantes y longitud.

Las 24 líneas DH que se testaron para cultivo *in vitro* se sembraron en cámara con condiciones controladas como se indicó anteriormente.

La toxicidad se midió en base a cinco criterios: número de regenerantes, número de regenerantes reales, longitud total, de tallo y raíz. Como se ve en la Figura 4.4 el boro reduce de manera notable la capacidad de regeneración de los embriones de cebada. También induce cambios en el desarrollo inhibiendo el crecimiento. Las diferencias entre líneas DH y tratamientos han resultados significativas a nivel $P < 0.001$ para todos los caracteres medidos.

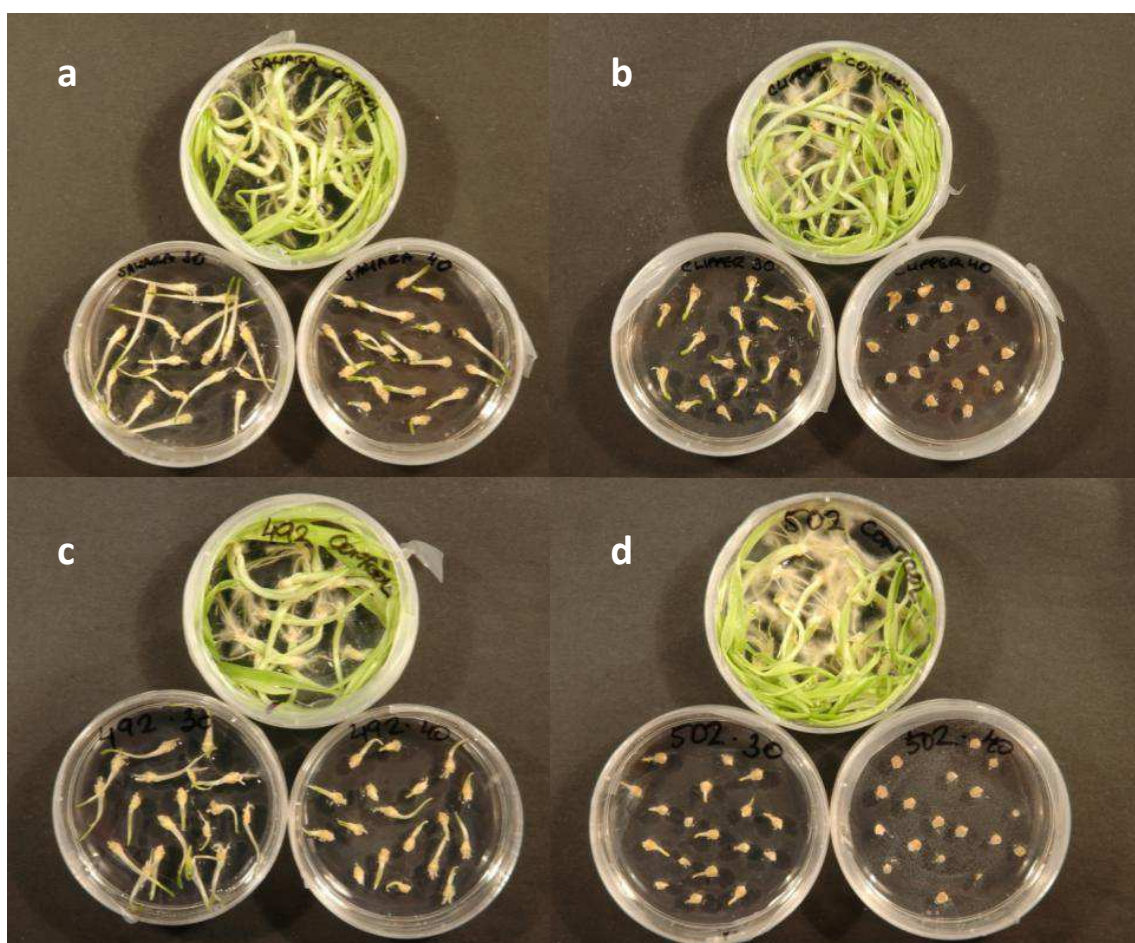


Figura 4.4 Placas de selección *in vitro* en medio de regeneración control, y tratamiento con boro 30 mM y 40 mM, en los genotipos a) Sahara, b) Clipper, c) línea DH SxC 492, d) línea DH SxC 502.

La distribución de frecuencias para el número de regenerantes, número de regenerantes reales, y las longitudes pueden consultarse en la Figura 4.5. La distribución del número de regenerantes muestra un comportamiento diferente respecto al resto de caracteres. Se trata de una distribución bimodal con segregación transgresiva significativa para una línea DH hacia los valores de Clipper. El número de regenerantes reales y la longitud de la raíz siguen una distribución desviada hacia los valores de Clipper y presentan segregación transgresiva hacia los resultados de Sahara y hacia los

de Sahara y Clipper, respectivamente. Una línea DH para el número de regenerantes reales y seis para la longitud de la raíz exceden significativamente ($P < 0.05$) los valores de Sahara. Cinco líneas DH fueron significativamente peores que Clipper para la longitud radicular. La longitud de tallo y la longitud total muestran una distribución normal sesgada hacia los valores de Clipper. Hay segregación transgresiva negativa significativa ($P < 0.05$), es decir, valores inferiores a los de la media de Clipper, para longitud total y la longitud de tallo (siete y ocho líneas DH, respectivamente), y segregación transgresiva significativa para tres líneas DH para longitud total.

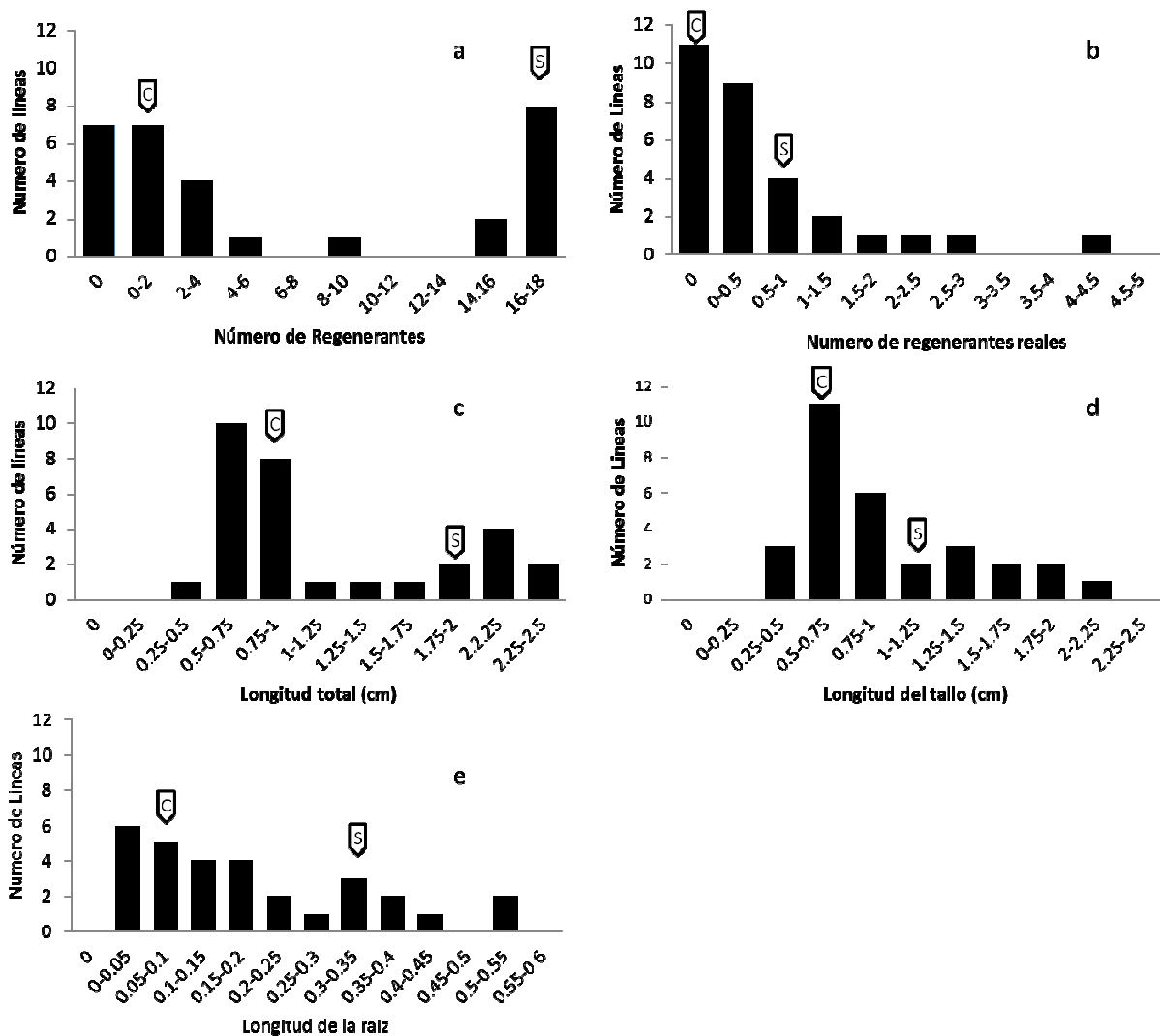


Figura 4.5 Distribución de frecuencias de las variables medidas en la selección *in vitro* con boro. a) número de regenerantes, b) número de regenerantes reales, c) longitud total de las plántulas, d) longitud del tallo, e) longitud radicular. Las flechas encuadradas indican el grupo al que pertenecen los parentales, C = Clipper, S= Sahara.

4.3.2.2. Asociación resultados con marcadores.

Debido a que las distribuciones de las variables no son normales se planteó la posibilidad de realizar transformaciones para aproximarlas lo más posible a una normal. Se aplicaron para el número de regenerantes y número de regenerantes reales una transformación de raíz cuadrada, y para las longitudes una logarítmica. En la

comparación de los residuos y el ajuste de los modelos de los datos transformados y los no transformados no se encontró ninguna mejora por lo que se continuaron los estudios con los datos no transformados.

La asociación entre los marcadores y los caracteres se evaluó mediante un análisis de componentes de varianza RELM (Residual Maximum Likelihood). Se observaron los efectos de cada locus y sus interacciones, además de los efectos de cada locus y sus interacciones bajo las dos concentraciones de boro, la letal con 40 mM y la subletal con 30 mM.

Los efectos que produjo el alelo Sahara (S) en los diferentes loci aparecen resumidos en la Tabla 4.6. El efecto de S en Bmac67 fue significativo para todos los caracteres exceptuando el NReg mientras que S en Bmac93 produjo efectos significativos únicamente sobre NReg. S en EBmac679 resultó altamente significativo para NReg, y las longitudes. Los efectos de S en estos loci fueron en todos los casos valores negativos, con la excepción de EBmac679 para LR, con un efecto de aumento de la longitud radicular en 0,008 cm.

Las interacciones entre los loci resultaron ser significativas solamente para el carácter NReg. Llama la atención que todas estas interacciones del alelo S tuvieron como efecto el aumento del NReg.

Tabla 4.6 Efectos determinados en el análisis RELM, del alelo Sahara en cada locus e interacción entre diferentes loci.

Locus o interacción	Carácter				
	NReg	NRReal	LT	LTa	LR
Bmac67	-0.115	-0.271 *	-1.284 **	-0.956 *	-0.329 **
Bmac93	-0.171 **	-0.382	-0.643	-0.651	0.008
EBmac679	-0.218 **	-0.290	-0.211 **	-0.215 **	0.008 **
Bmac67.Bmac93	0.337 *	0.382	-0.643	1.321	0.090
Bmac67.EBmac679	0.385 *	0.624	1.141	0.935	0.203
Bmac93.EBmac679	0.440 *	0.735	1.424	1.173	0.248
Bmac67.Bmac93.EBmac679	-0.857	-2.985	-3.193	-2.675	-0.515

**interacción significativa a $P < 0.001$, * interacción significativa a $P < 0.05$

Los efectos del alelo Sahara bajo el tratamiento subletal de 30 mM aparecen reflejados en la primera parte de la Tabla 4.7, y los efectos bajo el tratamiento letal de 40 mM en la segunda parte de la misma tabla.

El NReg se vio significativamente afectado por el alelo S cuanto este aparecía en cualquiera de los loci o sus combinaciones, a excepción del locus Bmac67 (que solo resultó significativo para las longitudes).

El efecto de S en el loci Bmac93 en ambos tratamientos fue disminuir el número de regenerantes, mientras que el efecto de S en EBmac679 fue aumentarlo. Los valores se mostraron más altos en el tratamiento letal, pudiendo aumentar el NReg en 13 plantas en el caso de EBmac679.

Los efectos de S en las combinaciones de tratamiento con dos loci (Trat.Bmac67.Bmac93, Trat.Bmac67.Bmac93 y Trat.Bmac67.Bmac93) y del tratamiento con los tres loci (Trat.Bmac67.Bmac93.EBmac679) variaron con el tratamiento aplicado:

- En el tratamiento de 30 mM Bmac67.Bmac93 y Bmac67.EBmac679 provocaron el aumento de NReg, mientras que la interacción Bmac93.EBmac679 y Bmac67.Bmac93.EBmac679 disminuyeron los valores.
- En el tratamiento de 40 mM. evidenciaron lo contrario.

Para el número de regenerantes reales se encontraron interacciones significativas para el tratamiento con EBmac679 y la interacción con los tres loci con el tratamiento. El efecto de S en estos loci provocó un aumento en el NRReal, observándose una disminución de los valores positivos en el tratamiento 40 mM.

Para las variables de longitud, LT, LTa y LR, en general se observaron los mismos efectos en ambos tratamientos. Las longitudes se vieron afectadas significativamente cuando aparece el alelo S en la interacción entre: tratamiento y Bmac67; tratamiento y EBmac679; y la interacción entre los tres loci y el tratamiento. En los tres casos el alelo S promovió un incremento de la longitud

Tabla 4.7 Efectos del alelo Sahara, determinados en el análisis RELM, en la interacción del tratamiento B3 o B4 con cada locus, e interacción con diferentes loci.

Tratamiento e interacción		Carácter				
B 30 mM	NReg	NRReal	LT	LTa	LR	
Bmac67	-1.089	-0.290	1.206 **	0.892 *	0.312 **	
Bmac93	-0.118 **	0.305	-0.643	0.617	-0.046	
EBmac679	1.387 **	2.142 **	1.384 *	1.159 *	0.226 *	
Bmac67.Bmac93	2.464 **	-0.396	-1.380	-1.312	-0.065	
Bmac67.EBmac679	0.358 **	-2.566	-2.340	-1.890	-0.446	
Bmac93.EBmac679	-0.022 **	-1.872	-1.443	-1.313	-0.129	
Bmac67.Bmac93.EBmac679	-1.473 **	4.713 *	4.237 **	3.615 **	0.616 *	
B 40 mM	NReg	NRReal	LT	LTa	LR	
Bmac67	-1.601	0.271	1.172 **	0.864 *	0.309 **	
Bmac93	-0.656 **	0.382	0.563	0.598	-0.033	
EBmac679	13.684 **	0.349 **	1.007 *	0.938 *	0.071 *	
Bmac67.Bmac93	-0.177 **	-0.382	-1.431	-1.319	-0.115	
Bmac67.EBmac679	-13.184 **	-0.683	-1.871	-1.608	-0.265	
Bmac93.EBmac679	1.538 **	-0.794	-1.355	-1.151	-0.206	
Bmac67.Bmac93.EBmac679	15.387 **	3.044 *	3.971 **	3.411	0.568 *	

**interacción significativa a $P < 0.001$, * interacción significativa a $P < 0.05$

Observando las medias predichas por el modelo para cada alelo (Figura 4.6) podemos comparar los resultados de cada loci:

Vemos que tanto en el tratamiento 30 mM como en el 40 mM el alelo Sahara en Bmac67 produce un valor más bajo que el alelo Clipper.

Para el loci EBmac679 ocurre lo contrario, el alelo Sahara produce más regenerantes y plántulas de mayor tamaño (solo en el caso de regenerantes reales en 40 mM disminuye el valor).

El alelo Sahara en Bmac93 produce más regenerantes, menos número de regenerantes reales y plantas con mayor tamaño en ambos tratamientos, solo con la

excepción de la longitud de raíz en el tratamiento 40 mM donde el valor es menor que el de Clipper.

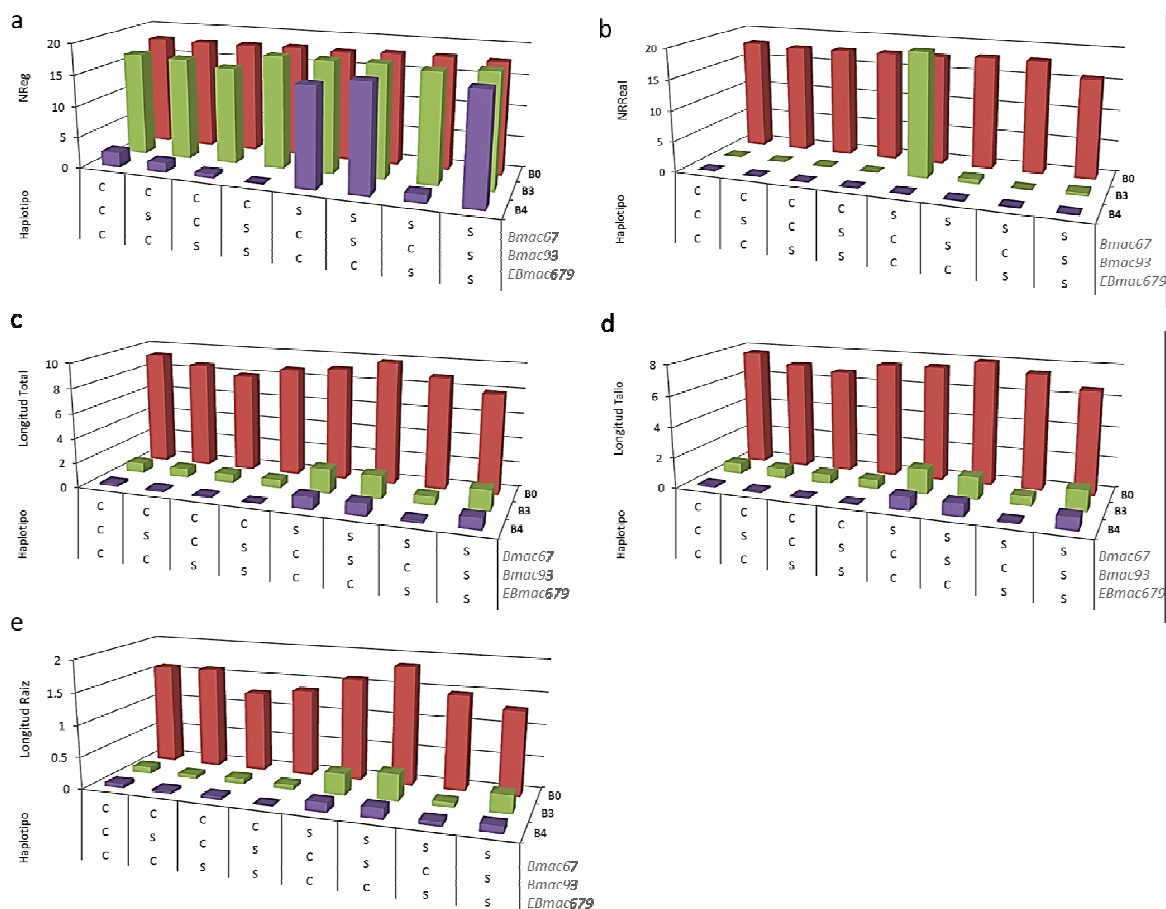


Figura 4.6 Valores medios de las variables según tratamiento y haplotipo: (a) Número de rengenerantes, (b) número de rengenerantes reales, (c) longitud total, (d) longitud de tallo, (e) longitud de raíz.

4.4. CARACTERIZACIÓN DE RESISTENCIA/ SUSCEPTIBILIDAD AL EXCESO DE BORO DE LA POBLACIÓN DH SAHARA x CLIPPER

El fenotipado consistió en la recopilación de los síntomas foliares causados por un exceso de boro en el agua de riego a los 12 días de germinación. Las hojas fueron escaneadas y analizadas con el software libre Compu Eye, Leaf & Symptom Area®. Se midieron tanto la superficie dañada como la superficie foliar como el porcentaje. Se clasificó el daño foliar en cuatro tipos de síntomas, que definimos como tipo I (amarilleo), tipo II (clorosis), tipo III (manchas marrones) y tipo IV (necrosis). La suma de todos ellos que da lugar al porcentaje de daño total.

4.4.1. Descripción de los resultados.

Finalmente se recogieron datos de un total de 113 líneas DH de las 123 sembradas.

La Figura 4.7 muestra el efecto del riego con una disolución de ácido bórico en los genotipos parentales, Albacete y tres líneas DH SxC. Mediante un análisis ANOVA se observaron diferencias significativas ($P < 0.001$) entre las Líneas DH, entre

tratamientos y su interacción para todos los caracteres estudiados. La variabilidad para el carácter superficie dañada queda registrada en la Tabla 4.8.



Figura 4.7 Síntomas de toxicidad de boro en la primera hoja de los cultivares Sahara, Clipper y Albacete y en las líneas DH SxC 366 y 473, después de 15 días de riego con agua normal (hojas de la izquierda) o solución de ácido bórico (hojas de la derecha). La barra equivale a un centímetro.

Tabla 4.8 Porcentaje de superficie dañada para las líneas DH de la población ClipperxSahara3771 y los cultivares Igri, Albacete, Plaisant y Steptoe. Datos recogidos a los 12 días de emergencia y bajo condiciones control y estrés por exceso de boro en el agua de riego.

Linea	Tratamiento				
	Control	Boro			
466	0,18	57,51	381	0,47	42,84
ALBACETE	0,02	55,21	CLIPPER	0,91	42,6
468	0,87	54,14	377	0,4	42,29
STEPTOE	0,19	54,12	470	0,43	40,86
471	0,22	53,3	479	0,13	40,7
501	0,1	47,83	917	0,32	40,55
465	0,14	47,6	467	0,11	40,43
912	0,72	47,38	356	0,86	40,02
355	0,43	47,22	920	0,33	39,14
279	0,09	46,23	458	0,11	38,26
464	0,24	45,91	516	0,13	37,48
IGRI	0,13	45,42	497	0,33	36,53
728	0,57	43,68	721	0,87	35,76
722	0,23	43,05	460	0,26	35,1
			PLAISANT	0,03	34,45
			716	0,87	33,41
					Continúa

Continuación

Linea	Tratamiento				
	Control	Boro			
502	0,59	32,51	925	0,17	16,75
373	0,09	32,23	378	0,18	16,65
891	0,16	31,89	708	0,18	16,46
913	0,37	31,77	706	0,41	15,6
519	0,08	31,2	720	0,15	15,55
368	0,2	29,75	365	0,21	15,11
732	10,25	28,38	504	0,61	15,11
898	0,33	28,3	724	0,27	14,83
493	0,59	27,34	500	0,64	14,75
485	1,9	26,92	374	0,27	14,66
506	0,02	26,79	915	0,6	14,65
510	0,68	26,62	482	0,24	14,5
704	0,43	26,3	923	0,46	14,36
462	0,14	26,25	889	0,13	14,11
498	0,61	25,21	916	0,03	13,54
367	0,13	24,96	489	0,61	13,24
369	0,16	24,7	922	0,04	13,23
457	0,48	24,49	275	0,19	13,16
733	0,19	24,01	517	0,32	13,12
491	1,06	23,62	366	0,05	12,8
892	0,59	23,37	362	0,12	12,73
475	1,36	23,32	477	0,06	12,68
280	0,18	23,03	904	0,55	12,43
481	0,74	22,81	901	0,04	12,37
494	0,7	22,23	907	0,06	12,25
705	0,44	21,65	710	0,16	12,21
277	0,16	21,63	513	0,18	12,08
488	0,27	21,45	713	0,17	11,84
714	1,06	21,04	278	0,19	11,13
371	0,46	20,09	899	1,02	11,11
709	0,25	19,71	361	0,09	10,69
902	0,14	18,28	463	0,04	9,31
503	0,46	17,74	474	0,12	8,96
370	0,07	17,67	518	0,07	8,12
375	0,44	17,35	276	0,08	7,71
515	0,53	17,31	927	0,29	7,12
926	0,55	17,19	921	0,89	6,88
924	0,35	17,13	499	0,42	5,98
511	0,15	17	514	0,22	5,81
703	0,37	16,88	473	0,11	4,93
376	0,66	16,87	492	0,22	4,74
729	0,09	16,83	363	0,68	4,62
			718	0,31	3,21
			725	0,40	2,73
			SAHARA	0,10	2,17
			928	1,24	1,49

En la Figura 4.8 se muestra la distribución de frecuencias del porcentaje de síntomas foliares bajo riego con solución de boro. Sigue una distribución normal ligeramente sesgada hacia valores bajos de daño foliar y se muestra una segregación transgresiva hacia los valores altos. Sólo una línea DH SxC presenta una segregación transgresiva negativa ($P < 0.05$), es decir, con un valor de daño foliar superior al de la media de Clipper. No se detectó ninguna segregación transgresiva positiva.

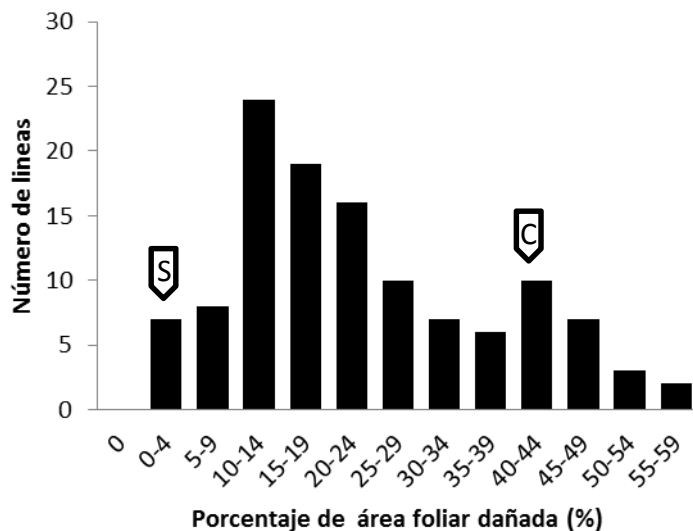


Figura 4.8 Distribución de frecuencias del carácter porcentaje de área foliar dañada (%) medida en la población Clipper x Sahara3771 bajo el tratamiento riego con solución de boro. Indico con flecha el grupo al que pertenecen los parentales: S =Sahara, C=Clipper

En la Tabla 4.9 aparecen reflejadas la separación de medias de la población para el carácter porcentaje de daño foliar realizado mediante el test Duncan.

Tabla 4.9 Separación de medias para el carácter porcentaje de daño foliar.

Línea	Medias
713	0.33 a
Sahara	1.14 a b c
928	1.44 a b c d
725	1.71 a b c d
718	1.76 a b c d
492	2.48 a b c d e
473	2.52 a b c d e
363	2.72 a b c d e f
514	3.01 a b c d e f g
499	3.27 a b c d e f g h
927	3.7 a b c d e f g h i
921	3.89 a b c d e f g h i
276	3.96 a b c d e f g h i
518	4.1 a b c d e f g h i j
474	4.54 a b c d e f g h i j k
708	4.94 a b c d e f g h i j k

Continúa

Continuación

925	5.37	a b c d e f g h i j k m
361	5.47	a b c d e f g h i j k m
278	5.66	a b c d e f g h i j k m n
926	5.67	a b c d e f g h i j k m n
513	6.13	a b c d e f g h i j k m n ñ
899	6.14	a b c d e f g h i j k m n ñ
907	6.16	a b c d e f g h i j k m n ñ
710	6.18	a b c d e f g h i j k m n ñ
901	6.2	a b c d e f g h i j k m n ñ
477	6.37	a b c d e f g h i j k m n ñ
362	6.42	a b c d e f g h i j k m n ñ
366	6.43	a b c d e f g h i j k m n ñ
904	6.63	b c d e f g h i j k m n ñ
922	6.63	b c d e f g h i j k m n ñ
275	6.68	b c d e f g h i j k m n ñ
517	6.72	b c d e f g h i j k m n ñ
916	6.78	b c d e f g h i j k m n ñ o
489	6.93	b c d e f g h i j k m n ñ o
889	7.12	b c d e f g h i j k m n ñ o
482	7.37	b c d e f g h i j k m n ñ o p
923	7.41	b c d e f g h i j k m n ñ o p
374	7.46	b c d e f g h i j k m n ñ o p
724	7.55	b c d e f g h i j k m n ñ o p
915	7.63	b c d e f g h i j k m n ñ o p
365	7.66	b c d e f g h i j k m n ñ o p
500	7.77	b c d e f g h i j k m n ñ o p q
720	7.92	b c d e f g h i j k m n ñ o p q
504	7.93	b c d e f g h i j k m n ñ o p q
706	8.07	b c d e f g h i j k m n ñ o p q
378	8.42	b c d e f g h i j k m n ñ o p q
729	8.46	b c d e f g h i j k m n ñ o p q r
511	8.65	b c d e f g h i j k m n ñ o p q r s
703	8.7	b c d e f g h i j k m n ñ o p q r s
924	8.74	b c d e f g h i j k m n ñ o p q r s
376	8.77	b c d e f g h i j k m n ñ o p q r s
370	8.87	b c d e f g h i j k m n ñ o p q r s
375	8.9	b c d e f g h i j k m n ñ o p q r s t
515	8.99	b c d e f g h i j k m n ñ o p q r s t
503	9.17	b c d e f g h i j k m n ñ o p q r s t
902	9.21	b c d e f g h i j k m n ñ o p q r s t
709	9.98	c d e f g h i j k m n ñ o p q r s t u
371	10.27	d e f g h i j k m n ñ o p q r s t u v
705	10.28	d e f g h i j k m n ñ o p q r s t u v
488	10.86	e f g h i j k m n ñ o p q r s t u v w
488	10.86	e f g h i j k m n ñ o p q r s t u v w

Continúa

Continuación

277	10.89	e f g h i j k m n ñ o p q r s t u v w
714	11.05	e f g h i j k m n ñ o p q r s t u v w
494	11.53	f g h i j k m n ñ o p q r s t u v w
280	11.61	f g h i j k m n ñ o p q r s t u v w w
481	11.77	g h i j k m n ñ o p q r s t u v w w y
892	12.05	h i j k m n ñ o p q r s t u v w w y z
507	12.08	h i j k m n ñ o p q r s t u v w w y z
733	12.1	h i j k m n ñ o p q r s t u v w w y z
369	12.43	i j k m n ñ o p q r s t u v w w y z
491	12.48	i j k m n ñ o p q r s t u v w w y z
457	12.48	i j k m n ñ o p q r s t u v w w y z
475	12.49	i j k m n ñ o p q r s t u v w w y z
367	12.55	i j k m n ñ o p q r s t u v w w y z
498	12.91	j k m n ñ o p q r s t u v w w y z !
462	13.19	k m n ñ o p q r s t u v w w y z !
506	13.41	k m n ñ o p q r s t u v w w y z !
704	13.43	k m n ñ o p q r s t u v w w y z !
510	13.65	m n ñ o p q r s t u v w w y z !
493	14.04	m n ñ o p q r s t u v w w y z !
898	14.38	n ñ o p q r s t u v w w y z !
485	14.41	n ñ o p q r s t u v w w y z !
368	14.97	ñ o p q r s t u v w w y z !
519	15.64	o p q r s t u v w w y z !
891	16.02	p q r s t u v w w y z !
913	16.14	p q r s t u v w w y z !
373	16.23	p q r s t u v w w y z !
502	16.55	q r s t u v w w y z !
Plaisant	17.24	r s t u v w w y z !
716	17.28	s t u v w w y z !
460	17.68	t u v w w y z !
721	18.46	u v w w y z !
516	18.8	v w w y z !
458	19.18	w w y z !
732	19.32	w w y z !
467	20.27	w y z !
479	20.42	y z !
356	20.44	y z !
470	20.65	z !
377	21.34	!
722	21.64	
381	21.65	
Clipper	21.76	
728	22.2	
Igri	22.77	
464	23.07	

Continúa

Continuación

279	23.16	& / () * "
465	23.87	/ () * "
355	23.9	/ () * "
501	24.04	/ () * "
912	24.12	/ () * "
497	25.15	() * "
468	27.5	* "
Albacete	27.62	* "
920	27.62	* "
466	28.85	"
917	29.03	
471	41.92	

*Diferentes letras o símbolos indican diferentes categorías ($p < 0.05$)

*En azul individuos con los tres alelos de Clipper y en naranja individuos con los tres alelos de Sahara.

La distribución de frecuencias para cada tipo de daño foliar aparece en la Figura 4.9. Para los síntomas de tipo I, II y III (zonas amarillentas secas, zonas vivas cloróticas, zonas marrones vivas, repectivamente) nos encontramos con distribuciones asimétricas sesgadas hacia valores bajos de daño, presentándose líneas DH con segregación transgresiva para valores altos de daño en todos los casos. La distribución de frecuencias para el daño tipo IV (necrosis) es aproximadamente normal. También presenta segregación transgresiva hacia los valores de Clipper.

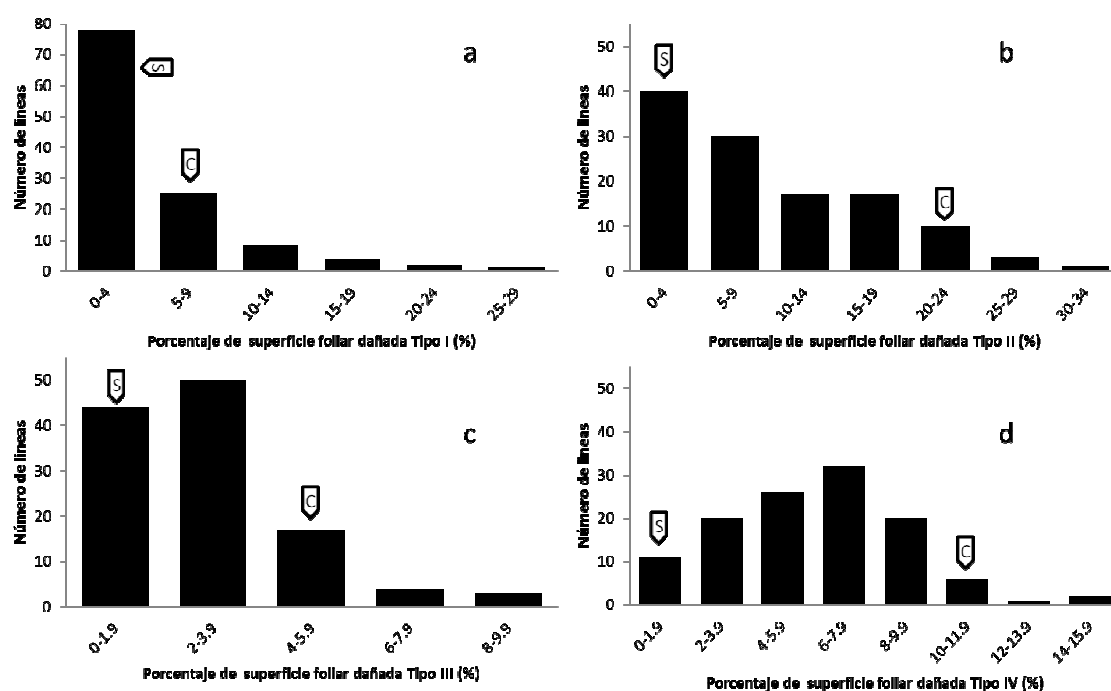


Figura 4.9 Distribución de frecuencias del carácter porcentaje de área foliar dañada (%) según tipo de síntomas, a) tipo I, b) tipo II, c) tipo III, d) tipo IV. Medida en la población Sahara3771x Clipper bajo el tratamiento riego con solución de boro. Se indica con una flecha el grupo al que pertenecen los parentales: S=Sahara, C=Clipper

4.4.2. Asociación de los resultados con los marcadores moleculares.

Los daños foliares aumentaron significativamente ($P < 0,001$) bajo el riego de boro, pero observamos que las diferencias de la magnitud de estos daños varía en función del haplotipo. Mediante el análisis de los componentes de varianza RELM de Genstat determinamos que existe una asociación significativa entre el porcentaje de superficie dañada con cada locus y entre la variable con los tres loci, es decir, hay efectos epistáticos significativos entre todos los loci. En la Tabla 4.10 describe las medias predichas por el modelo para el porcentaje de daño foliar para cada alelo o su interacción. La mayor diferencia entre los alelos de Sáhara y Clipper se produce en el marcador Bmac93, como se esperaba. El alelo Sahara confiere mayor protección contra las concentraciones de boro tóxicas en todos los loci. Mirando las interacciones vemos que, siempre que tengamos el alelo S en Bmac93, la tolerancia es mayor cuantos más alelos S están presentes en los otros loci. Tener un alelo Clipper en Bmac93 y un alelo de Sáhara en los otros sitios es casi peor que tener todos los alelos de Clipper en los tres loci.

Tabla 4.10 Medias de porcentaje de daño foliar para cada loci o interacción.

Interacción	Alelo	Media	Error estándar de la diferencia
Bmac67	C	11,70	1,266
	S	10,02	
Bmac93	C	13,28	1,266
	S	8,45	
EBmac679	C	12,33	1,266
	S	9,39	
Bmac67/Bmac93/EBmac679	SSS	4,26	2,511
	CSS	8,92	
	SSC	10,12	
	CSC	10,48	
	CCS	10,67	
	SCC	12,01	
	SCS	13,72	
	CCC	16,74	
Bmac67/EBmac679	CC	27,13	2,219
	SC	21,82	
	CS	19,00	
	SS	17,87	

En la Tabla 4.11 aparecen los efectos que produce el alelo Sahara con respecto al Clipper (tomando el valor de Clipper como referencia). El efecto medio del alelo Sahara en cada loci resulta en una disminución del daño foliar significativa. La interacción de cada loci con el tratamiento nos muestra unos efectos de disminución de los síntomas muy marcada y significativa, al igual que la interacción del tratamiento con todos los loci. La interacción entre el tratamiento/Bmac67/EBmac679 resulta en un aumento de los síntomas.

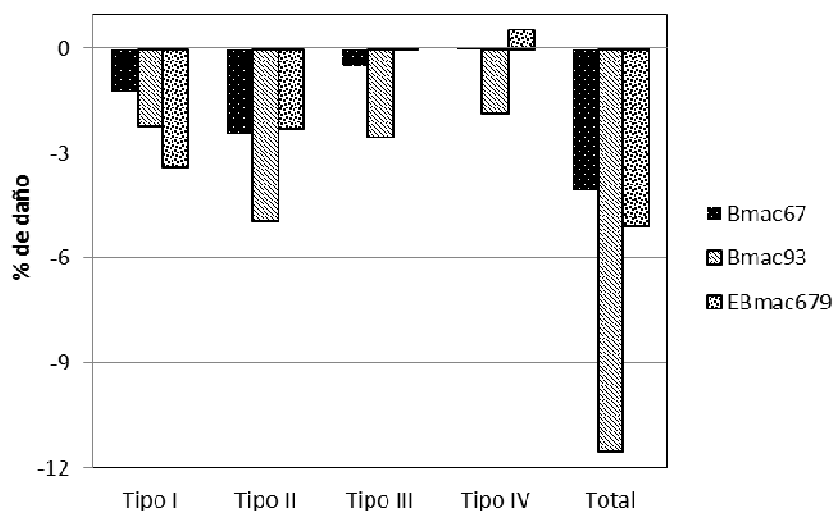
Tabla 4.11 Efectos del alelos Sahara en el carácter porcentaje de daño foliar, para cada interacción.

Interacción	Efecto del alelo Sahara		Error estándar
Bmac67	-0,47	**	2,308
Bmac93	-0,77	**	3,292
EBmac679	-0,83	*	2,727
Bmac67.Bmac93	1,37		4,605
Bmac67.EBmac679	0,51		3,860
Bmac93.EBmac679	2,66		4,849
Bmac67.Bmac93.EBmac679	-2,41	*	6,524
Trat.Bmac67	-8,52	**	2,770
Trat.Bmac93	-10,98	**	3,954
Trat.EBmac679	-10,48	**	3,292
Trat.Bmac67.Bmac93	6,00		5,530
Trat.Bmac67.EBmac679	14,53	*	4,631
TRAT.Bmac93.EBmac679	3,69		5,827
TRAT.Bmac67.Bmac93.EBmac679	-19,33	*	7,842

**interacción significativa a $P < 0.001$, * interacción significativa a $P < 0.05$

En el estudio tomamos en cuenta el daño foliar dividiendo los síntomas en cuatro tipos, tal como se describe en material y método. Esto nos dio la posibilidad de buscar cualquier interacción entre las tipos de daño y marcadores por “multivariate RELM”. Los resultados se resumen en la Figura 4.10. Se observaron diferencias significativas ($P < 0,001$) entre tratamiento y tipo de síntoma, así como las interacciones significativas entre cada síntoma y cada loci.

El alelo Sahara del locus EBmac679 está relacionado con un aumento de la tolerancia al boro en las dos primeros tipos de daño de hoja (amarilleo y clorosis). Sin embargo no tiene ningún efecto en el daño de tipo III (comienzo de necrosis), ni en el aumento de la necrosis final (tipoIV). Para Bmac67 el alelo Sahara muestra un efecto protector en los tres primeros tipos y ningún efecto en el tipo IV. El alelo Sahara en Bmac93 aumenta la tolerancia a lo largo de todo el desarrollo de daños.

**Figura 4.10** Efectos, expresados como porcentaje de daño foliar, de los alelos Sahara bajo el tratamiento de riego con ácido bórico en las diferentes fases de desarrollo de daño foliar.

Los efectos significativos del alelo S según loci o interacción para cada tipo de daño aparece en la Tabla 4.12:

El tipo de daño I se ve disminuido por el alelo S en cualquiera de los loci, siendo el efecto más marcado bajo las condiciones de estrés (Trat.loci).

En el daño de tipo II ocurre lo mismo que para el tipo I, con la diferencia de que la interacción Trat.Bmac67.Bmac93 incrementa los daños y la triple interacción es significativa disminuyendo de manera muy marcada el área dañada.

En el daño de tipo III solo influye el locus Bmac93, la interacción de los tres loci, provocando una reducción marcada de los daños.

Para el daño de tipo IV el alelo S confiere disminución de la superficie dañada bajo las condiciones de estrés, al igual que sucede con la interacción Trat.Bmac67.Bmac93.

Tabla 4.12 Efectos sobre el tipo de daño de los loci, sus interacciones y las interacciones de los loci con el tratamiento

Loci e interacciones	Tipo de daño			
	I	II	III	IV
Bmac67	-0.264 *	-0.222 *	-0.011	-0.044
Bmac93	-0.308 *	-0.643 **	0.004 **	0.049 **
EBmac679	-0.469 **	-0.350	-0.164	-0.114
Bmac67.Bmac93	0.277	0.860	0.095	0.097
Bmac67.EBmac679	0.362	0.182	0.029	0.045
Bmac93.EBmac679	0.603	1.042	0.888	0.272
Bmac67.Bmac93.EBmac679	-0.500	-0.828 *	-0.808 *	-0.332
Interacciones con tratamiento	I	II	III	IV
Trat.Bmac67	-1.514 *	-5.054 *	-1.251	-0.005
Trat.Bmac93	-2.700 **	-4.382 **	-1.848 **	-1.310 **
Trat T.EBmac679	-3.998 **	-4.324 *	-1.138	0.097
Trat.Bmac67.Bmac93	1.425	4.069	0.438	-0.594 *
Trat T.Bmac67.EBmac679	1.951	7.103	3.141	1.323
Trat.Bmac93.EBmac679	2.089	0.053 *	0.596	0.366
Trat Bmac67.Bmac93.EBmac679	-3.960	-9.284 *	-3.960 *	-1.408

**interacción significativa a $P < 0.001$, * interacción significativa a $P < 0.05$

4.5. GENOTIPADO DE LA POBLACIÓN DH SAHARA x CLIPPER.

Se completó el genotipado en un total de 113 líneas DH SxC de las 124 que constituyen la población, y en cuatro variedades: Clipper, Sahara, Albacete e Igri.

- Para siete de las 124 no se obtuvieron bandas: 70469, 70480, 70495, 70497, 70712, 70716, 70731

- Para cuatro se obtuvieron bandas en dos de las tres secuencias amplificadas: 70912, 70927, 70928, 70898

Tabla 4.13 Haplotipos en la población DH SxC, los cultivares Sahara y Clipper, y clasificación de cada línea según el número de carreras.

Línea	Locus			Carreras
	Bmac93	Bmac67	EBmac679	
70275	S	S	C	2
70276	C	S	C	6
70277	S	C	S	6
70278	C	S	C	2
70279	C	S	S	2
70280	C	C	C	6
70355	C	S	S	2
70356	C	C	C	2
70357	C	C	C	2
70359	C	S	S	2
70361	C	S	C	6
70362	S	C	S	6
70363	S	S	S	6
70365	S	S	C	6
70366	C	C	C	6
70367	C	C	S	2
70368	C	S	S	2
70369	C	C	C	6
70370	C	C	C	6
70371	C	S	C	6
70373	C	C	S	6
70374	S	C	S	6
70375	S	S	S	6
70376	S	C	S	2
70377	C	S	S	6
70378	C	C	C	2
70381	C	C	S	6
70457	C	C	C	6
70458	C	C	S	2
70460	C	S	S	6
70462	C	C	C	2
70463	C	C	S	2
70464	C	C	C	2
70465	C	C	C	2
70466	C	C	C	2
70467	C	C	C	2
70468	C	C	C	2
70469	-	-	-	2
70470	C	C	C	2
70471	C	C	C	2
70473	S	S	S	6
70474	C	S	C	2
70475	C	C	C	2
70477	C	S	S	6
70478	S	C	C	2
70479	C	S	S	2
70480	-	-	-	
70481	S	S	C	2
70482	C	C	S	2
70485	S	S	C	6
70487	C	C	S	2
70488	S	C	S	6
70489	S	C	S	6
70491	S	C	C	6
70492	S	S	S	6
70493	C	S	C	2
70494	C	S	S	6
70495	-	-	-	2
70497	-	-	-	6
70498	S	S	C	2
70499	S	S	S	6
70500	S	S	S	6
70501	C	S	C	6
70502	S	C	C	2
70503	S	C	C	6
70504	C	S	C	6
70506	S	C	C	6
70507	C	C	S	2
70510	S	S	C	6
70511	C	S	S	6
70513	S	C	C	6
70514	S	S	S	6
70515	C	C	C	2
70516	C	S	C	2
70517	S	S	C	6
70518	C	C	S	2
70519	C	S	C	6
70703	C	C	S	2
70704	C	S	S	6
70705	S	C	C	2
70706	C	S	C	2
70708	S	C	C	6
70709	C	C	C	6
70710	C	C	S	6
70712	-	-	-	2
70713	C	C	S	6
70714	C	C	C	6
70715	C	S	C	6
70716	-	-	-	2
70718	S	S	S	6
70720	S	C	C	6
70721	C	C	C	2
70722	C	C	S	2
70724	C	C	C	6
70725	S	S	S	6
70728	C	S	S	2
70729	C	S	C	6
70731	-	-	-	6
70732	S	C	S	6
70733	C	C	C	2
70889	S	S	C	6
70891	C	C	C	6
70892	S	C	C	2
70893	C	S	C	2
70898	-	C	S	6
70899	C	S	C	2
70901	C	S	C	2
70902	C	S	C	2
70904	S	S	S	6

Continúa

<i>Continuación</i>									
70907	S	S	S	6	70924	C	S	S	2
70912	C	S	-	2	70925	C	S	S	2
70913	C	S	C	2	70926	C	S	S	2
70915	C	S	S	2	70927	C	-	S	2
70916	C	S	S	2	70928	S	-	S	6
70917	C	C	C	6	Sahara	S	S	S	6
70920	C	S	C	6	Clipper	C	C	C	2
70921	S	S	S	6	Albacete	C	S	C	6
70922	S	S	S	6	Igri	C	C	C	2
70923	C	S	C	6					

En la Tabla 4.14 aparecen recopiladas la frecuencia con que aparece cada haplotipo. Podemos observar una distorsión significativa de la segregación esperada para el marcador Bmac93, obteniéndose 75 líneas DH con el alelo C y 38 con el S. Para Bmac67 obtenemos 55 y 58, y para EBmac679 63 y 50 líneas DH con alelos C o S, respectivamente. Respecto al número de carreras se obtuvieron 58 plantas de dos carreras y 55 de seis.

Tabla 4.14 Número de líneas DH con los alelos de Clippero o Sahara para cada marcador.

Alelo	Número de líneas		
	Bmac93	Bmac67	EBmac679
C	75	55	63
S	38	58	50

Tabla 4.15 Frecuencia de los haplotipos obtenidos en el genotipado con los marcadores Bmac93, Bmac67 y EBmac679.

Haplotipo	Nº de líneas
SSS	13
SSC	8
SCC	10
SCS	7
CSC	20
CSS	17
CCS	13
CCC	25
C_S	1
S_S	1
_CS	1
CS_	1
desconocido	7
TOTAL	124

*Una línea “_” indica alelo desconocido para el marcador correspondiente.

4.6. COMPARACIÓN ENTRE PARÁMETROS DE LA POBLACIÓN DH SAHARA x CLIPPER.

En la Tabla 4.16 se detallan los coeficientes de correlación por pares entre los rasgos medidos en invernadero y los de experimentos de selección *in vitro*: porcentaje de área foliar dañada, el número de regenerantes y el número de regenerantes reales, longitud total, de tallo y raíz. Existe una correlación negativa entre el daño de la hoja y las variables de la selección *in vitro*, lo que parece ser lógico: cuantas más lesiones están presentes en las hojas, menos tolerante es la línea, y por lo tanto, es de esperar una regeneración pobre en medios de selección que contenga una concentración de boro tóxica. Encontramos las correlaciones más bajas entre el número de regenerantes y todos los otros caracteres, con valores que van desde 0.598 con número de regenerantes reales, a 0,614 con la longitud total. De todas maneras se trata de valores altos para los sistemas de cultivo *in vitro*. La correlación mayor la encontramos entre número de regenerantes reales y cualquiera de las longitudes, variando los valores entre 0.96 y 0.984.

Tabla 4.16 Correlaciones entre todas la variables medidas en el fenotipado y la selección *in vitro*

% daño foliar	1					
NR	-0.578	1				
NRReal	-0.759	0.598	1			
LT	-0.76	0.614	0.984	1		
LR	-0.739	0.605	0.96	0.974	1	
LTa	-0.759	0.612	0.983	0.999	0.961	1
	% daño foliar	NR	NRReal	LT	LR	LTa

En la Figura 4.11 aparecen los resultados de la línea DH 492 para selección *in vitro* y efectos de riego con exceso de boro. Esta línea presenta los tres alelos de Sahara en los tres loci.

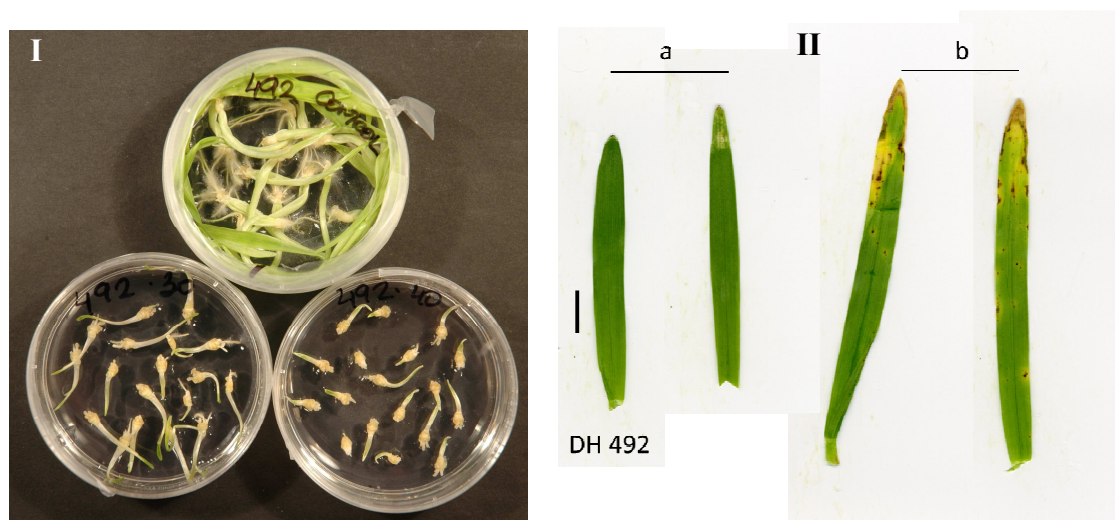


Figura 4.11 Línea DH 492 (I) Resultados para selección *in vitro* en diferentes concentraciones de boro (II) Sintomas foliares del exceso de boro (a) controles (b) regadas con agua con exceso de boro.

4.7. SELECCIÓN *IN VITRO* DE LA POBLACIÓN DH CHEVRON x PI383933

4.7.1. Determinación de la concentración de cribado

Se comprobó el crecimiento *in vitro* de embriones inmaduros de los cultivares Chevron, PI383933 y Legacy en medio de regeneración con siete concentraciones crecientes de DON y control sin toxina. Las variables medidas fueron el número de regenerantes, el número de regenerantes reales, las longitudes del tallo y de la raíz y el peso fresco de las plántulas recuperadas.

Con esta primera prueba se pretendía determinar si existían diferencias de crecimiento significativas en el medio de selección entre los genotipos parentales, y en caso de ser así determinar qué concentración era la que nos permitía realizar esta diferenciación. Se realizó el estudio con concentraciones de: 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, y 15 mg DON/L, y control sin toxina (Figura 4.12).

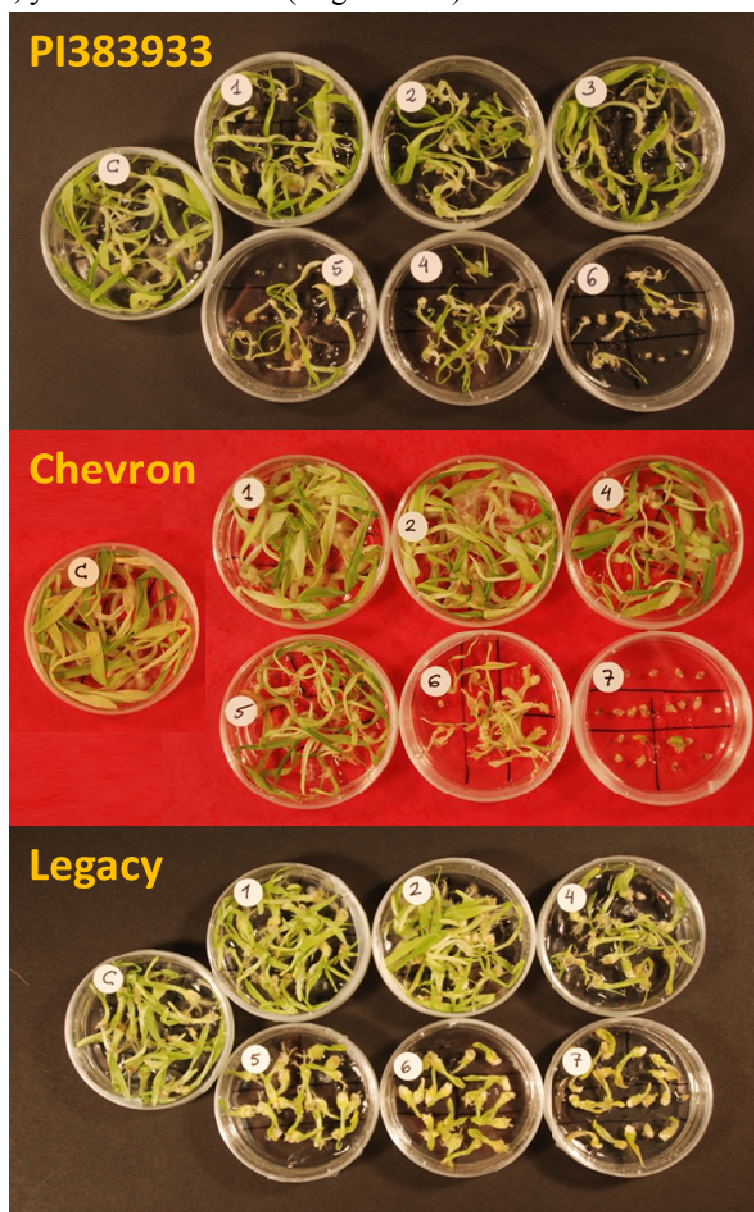


Figura 4.12 Placas de selección para la línea PI383933, y los cultivares Chevron y Legacy. C= control, 1=0,1 mg de DON/L; 2=0,5 mg de DON/L; 3= 1 mg de DON/L; 4= 2,5 mg de DON/L; 5= 5 mg de DON/L; 6= 10 mg de DON/L; 7= 15 mg de DON/L

*Para PI383933 falta la concentración 7 en la que no se obtuvieron regenerantes.

Al igual que sucedía en la determinación de la concentración de cribado para boro, el aumento de concentración de DON en el medio de regeneración tiene como resultado una disminución del crecimiento en las plántulas de cebada de los distintos genotipos.

En este trabajo la concentración letal en embriones inmaduros es la concentración 7 (15 mg /L) para los tres genotipos. Se comienzan a ver una disminución en la regeneración y regeneración real para la concentración 2 (0,5 mg /L) en PI383933 y en la concentración 4 (2,5 mg /L) para Chevron. Legacy no presenta casi variación en el número de regenerantes aunque sí en los regenerantes reales, siguiendo una curva similar a la de Chevron.

Respecto a la longitud de las plántulas también vemos como disminuye a medida que aumenta la concentración de DON en el medio. Este descenso es más acusado en Chevron que en PI383933 o Legacy. El mismo efecto se observa en la longitud del tallo y de la raíz. Sin embargo, en las concentraciones de toxina más bajas observamos un aumento en el crecimiento de las raíces de Chevron, la variedad resistente. A medida que aumentamos la concentración, el crecimiento de la raíz sufre una caída muy brusca, situándose esta longitud en la concentración 5 (5 mg /L) por debajo del de PI383933, la línea sensible a *Fusarium*.

El peso fresco también decae a medida que aumenta la concentración de toxina en el medio. Legacy presenta un pequeño aumento de peso en las concentraciones de 0,1, y 0,5 mg/L que no se observa en los otros dos genotipos.

Las variables siguen todas unas distribuciones normales exceptuando el número de regenerantes y número de regenerantes reales. Se aplicaron transformaciones a estos datos para aproximarlas a una Normal, pero como no se obtuvo ninguna mejora se mantuvieron los datos sin transformar.

Se consideran regenerantes aquellos embriones que muestran embriogénesis u organogénesis. No hay diferencias significativas entre genotipos y tratamientos para esta variable.

No se observan diferencias significativas para la variable peso fresco. Si se encontraron diferencias significativas para las variables de longitud y el número de regenerantes reales.

Como en el caso del boro, las plántulas obtenidas en el medio de regeneración FHG fueron transferidas a medio de enraizamiento en cajas Magenta para comprobar su capacidad de recuperación (Figura 4.14). Se obtuvieron resultados parecidos a los del boro ya que las concentraciones mayores de DON no permitieron el desarrollo posterior de las plántulas, como puede observarse en la Figura 4.14. En el caso de Chevron solo llegaron a enraizar las plántulas hasta la concentración 5 (5 mg/L), y en el caso de PI383933 en la concentración 6 (10 mg /L). El crecimiento de Legacy es peor que el de los genotipos anteriores, desarrollándose con dificultad en la concentración de 2,5 mg/L.

No se testaron en este ensayo de enraizamiento en caja Magenta las plántulas de la concentración 7 de PI383933 porque no hubo regenerantes, ni de Chevron. Tampoco se incluyeron en este ensayo las concentraciones 1, 2 y 3 puesto que nos interesaban aquellas concentraciones en las que el crecimiento del parental sensible se viese comprometido y no el del parental resistente.

Teniendo en cuenta todo lo anterior se tomó como concentración de cribado la situada entre la concentración 5 y la concentración 6, es decir, 7,5 mg DON/L, que permitiría el desarrollo de líneas DH con una resistencia superior al parental sensible.

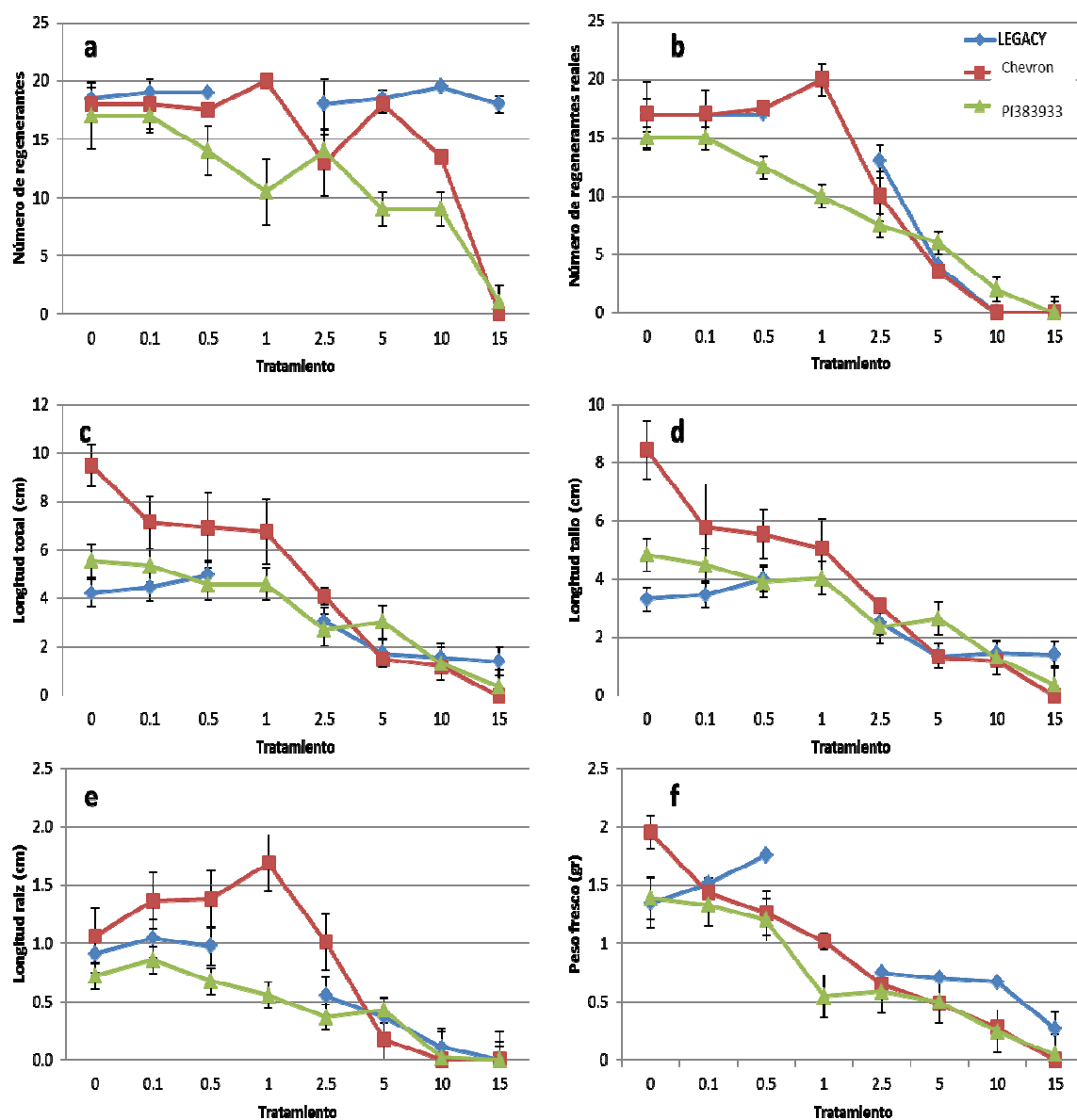


Figura 4.13 Efecto de concentraciones crecientes de DON (tratamientos) en a) número de regenerantes, b) número de regenerantes reales, c) longitud total de las plántulas, d) longitud del tallo, e) longitud radicular, f) peso fresco.

±error típico (barras). Valores medios de tres repeticiones.

*En el caso de Legacy se contaminaron dos repeticiones con lo que no se incluyen los datos en la gráfica.

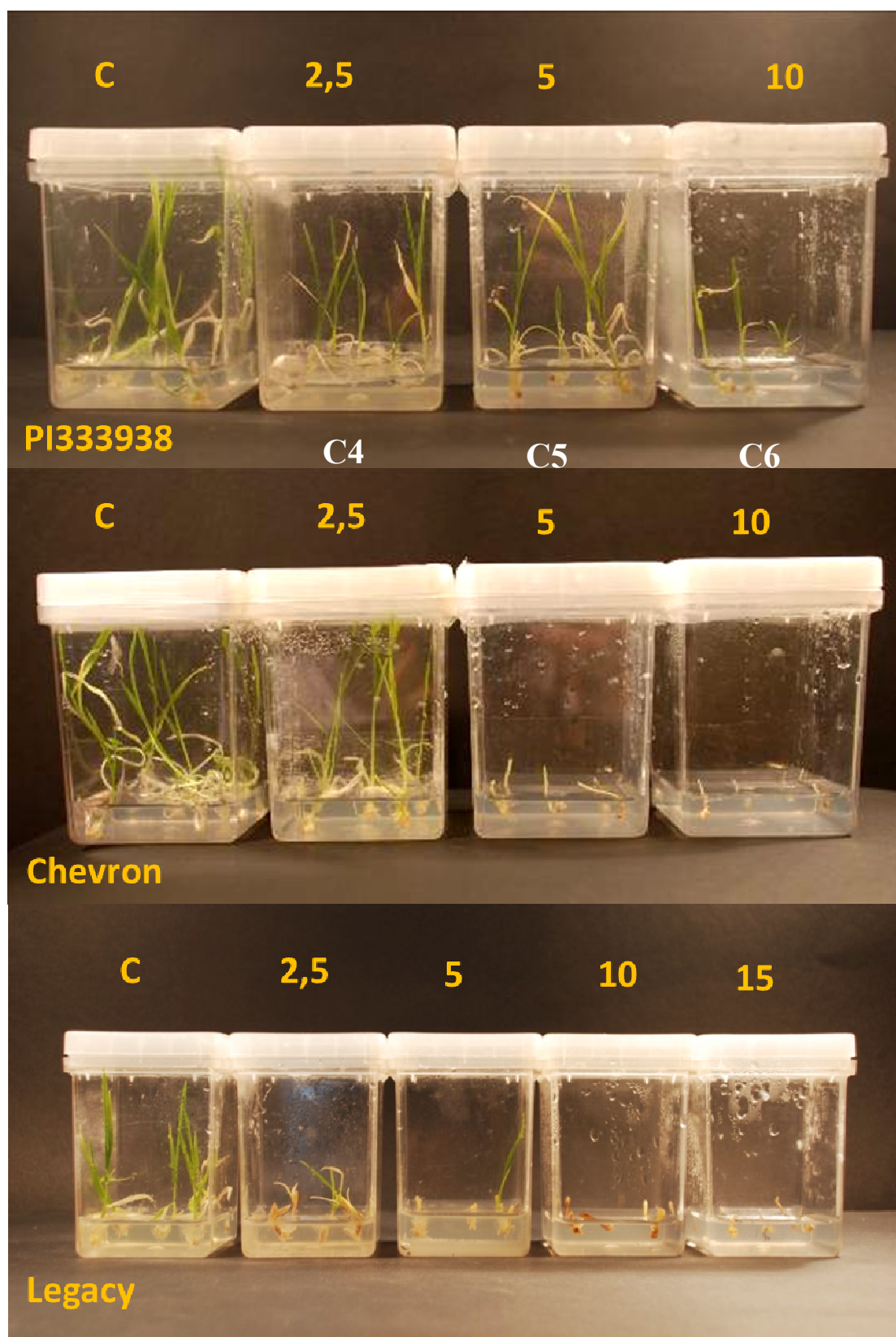


Figura 4.14. Cajas Magenta con medio de enraizamiento. Contiene plántulas transplantadas a medio de enraizamiento de tres genotipos, PI383933, Chevron y Legacy, provenientes de placas de regeneración control, 2,5 mg de DON/L; 5 mg de DON/L; 10 mg de DON/L; y 15 mg de DON/L.

4.7.2. Selección *in vitro*

Se analizaron un total de 104 líneas DH Chevron x PI383933 y los parentales en dos series, la primera en invernadero y la segunda en semillero, siguiendo el protocolo que se explica en material y métodos. Finalmente, debido a problemas de contaminación en cámara, se recogieron datos de 29 líneas DH en la Serie I y 27 líneas DH en la serie II.

En las Figura 4.15 y Figura 4.16 aparecen las distribuciones de frecuencias para cada variable en las Series I y II, respectivamente. En ambos casos, las variables siguen una distribución normal exceptuando el número de regenerantes y el número de regenerantes reales. Se aplicó la transformación a raíz cuadrada de estos datos pero no se obtuvo ninguna mejora por lo que se mantuvieron los valores sin transformar.

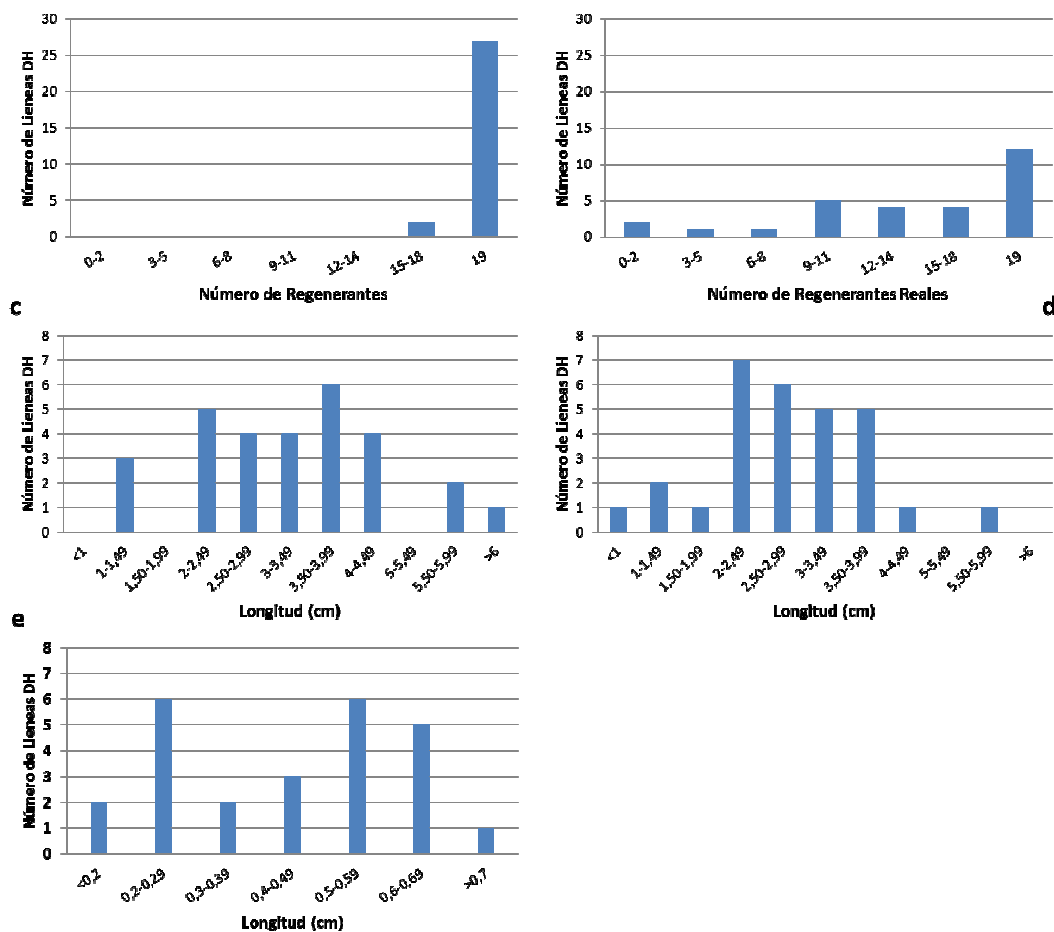


Figura 4.15. Distribución de frecuencias de la Serie I bajo condiciones de estrés para las variables a) Número de regenerantes, b) número de regenerantes reales, c) Longitud total, d) Longitud de tallo, e) Longitud de raíz.

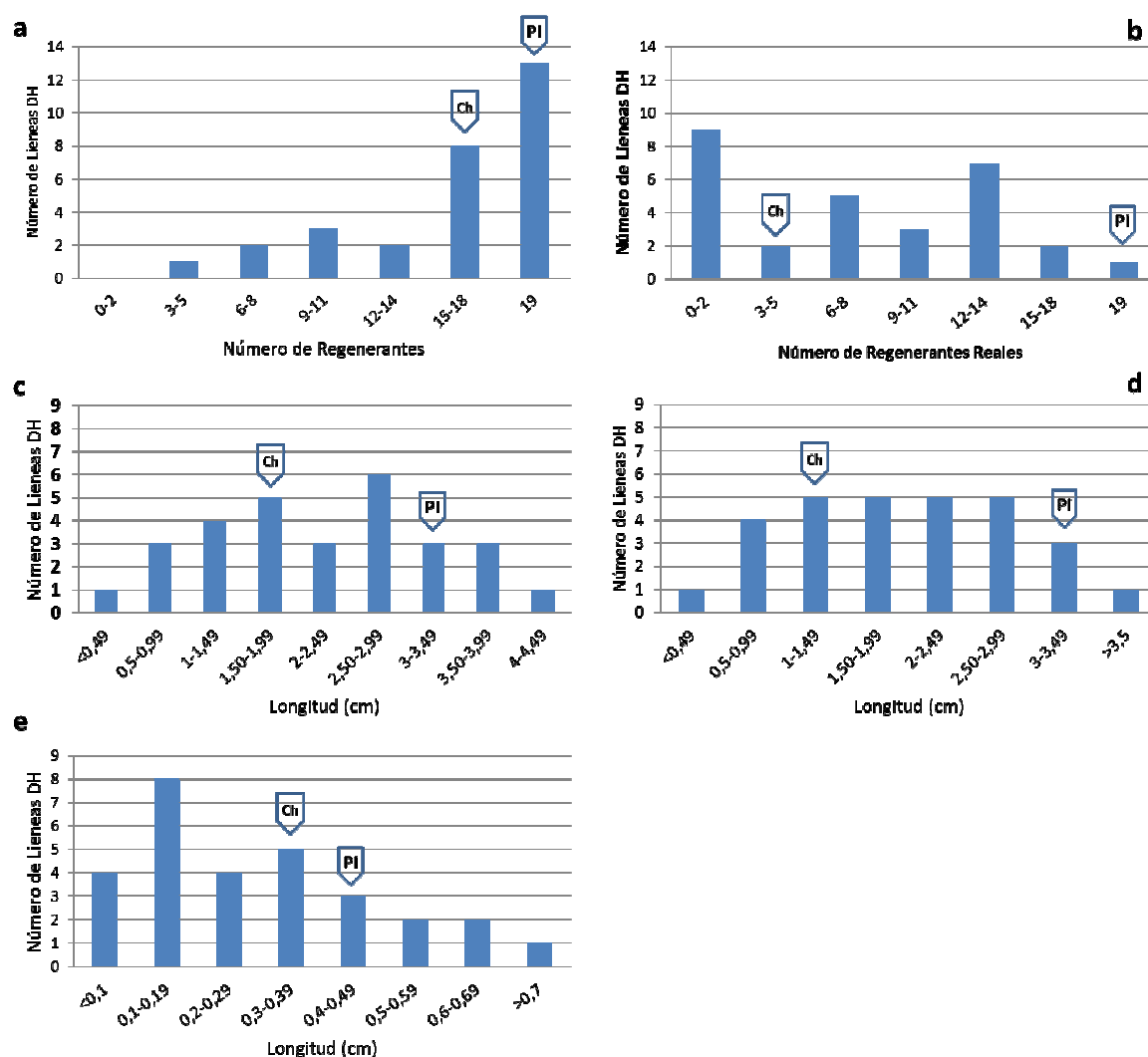


Figura 4.16 Distribución de frecuencias de la Serie II bajo condiciones de estrés para las variables a) Número de regenerantes, b) número de regenerantes reales, c) Longitud total, d) Longitud de tallo, e) Longitud de raíz. En flechas aparece el grupo al que pertenecen los parentales, Ch=Chevron y PI=PI383933.

Entre las series I y II existen un total de 14 líneas DH coincidentes. Realizando un ANOVA comprobamos que existen diferencias significativas entre las dos series y que también existen diferencias significativas en las interacción Línea-Serie. Estas diferencias pueden ser debidas a que las condiciones ambientales en invernadero y en semillero varían. Por ello, y puesto que no podemos realizar ninguna corrección con un coeficiente para igualar los datos, para el análisis estadístico hemos considerado las dos series como experimentos independientes.

En las tablas 4.17 a 4.20 aparecen las separaciones de medias de todas las líneas DH para cada variable y en cada una de las series.

Tabla 4.17 Separación de medias Duncan realizada para los DH de la población Chevron x PI383933 de la serie I para las variables número de regenerantes (NR) y número de regenerantes reales (NRReal).

Línea	NR	Línea	NRReal
740	19.82 a	428	20.42 a
751	19.82 a	434	20.42 a
753	19.82 a	454	20.42 a
754	19.82 a	758	20.42 a
424	19.8 a	424	19.92 a
426	19.8 a	763	19.92 a
428	19.8 a	426	19.42 a
434	19.8 a	791	19.42 a
454	19.8 a	740	19.38 a
739	19.8 a	754	19.38 a
741	19.8 a	453	19.33 a
758	19.8 a	751	19.13 a b
763	19.8 a	435	18.92 a b
775	19.8 a	811	18.92 a b
789	19.8 a	741	17.92 a b
811	19.8 a	790	17.42 a b
787	19.57 a	738	17.13 a b
453	19.5 a	429	16.92 a b c
414	19.32 a	775	16.92 a b c
796	19.32 a	789	15.92 a b c
435	19.3 a	787	15.88 a b c
790	19.3 a	414	15.63 a b c
791	19.3 a	736	15.63 a b c
737	19.17 a b	753	15.38 a b c
738	19.07 a b	796	14.88 a b c
736	18.82 a b	739	13.42 b c d
768	18.8 a b	737	11.33 c d
417	17.97 b c	768	8.92 d
429	17.3 c	417	8.44 d

*Las Líneas con la misma letra no son diferentes significativamente ($P < 0.05$)

Tabla 4.18 Separación de medias Duncan realizada para los DH de la población Chevron x PI383933 de la serie I para las variables: longitud total, longitud de raíz y longitud de tallo.

Línea	LT	Línea	LR	Línea	LTa
758	6.037 a	758	1.6869 a	791	4.98 a
435	5.765 a b	741	1.6218 a	435	4.65 a b
791	5.745 a b	790	1.3086 b	758	4.391 a b c
453	5.374 a b c	429	1.1984 b c	453	4.236 a b c d
740	5.014 b c d	753	1.1659 b c d	740	4.221 a b c d
454	4.95 b c d	454	1.1518 b c d	754	4.133 a b c d
428	4.85 b c d e	453	1.1376 b c d	428	4.033 b c d e
429	4.85 b c d e	435	1.1198 b c d	751	3.847 b c d e f
754	4.845 b c d e	424	0.9893 c d e	454	3.803 b c d e f g
741	4.837 b c d e	751	0.9059 d e f	434	3.801 b c d e f g
751	4.752 c d e f	428	0.8218 e f g	738	3.711 c d e f g h
424	4.675 c d e f	417	0.8201 e f g	424	3.691 c d e f g h
790	4.668 c d e f	796	0.8171 e f g h	426	3.691 c d e f g h
753	4.664 c d e f	763	0.8168 e f g h	763	3.688 c d e f g h
763	4.5 c d e f g	740	0.7947 e f g h	429	3.657 c d e f g h
738	4.478 c d e f g	768	0.7715 e f g h i	811	3.556 c d e f g h i
434	4.462 c d e f g	791	0.7707 e f g h i	789	3.518 c d e f g h i
426	4.4 c d e f g	739	0.7493 e f g h i	753	3.499 c d e f g h i
787	4.08 d e f g h	775	0.7193 e f g h i	787	3.469 d e f g h i j
811	4.062 d e f g h	426	0.7143 e f g h i	790	3.365 d e f g h i j
789	4.05 d e f g h	754	0.7134 e f g h i	741	3.221 e f g h i j k
796	3.949 e f g h	738	0.7041 f g h i	736	3.148 e f g h i j k
736	3.786 f g h	737	0.688 f g h i	796	3.133 e f g h i j k
414	3.64 g h	414	0.6734 f g h i	414	2.968 f g h i j k
775	3.637 g h	434	0.6668 f g h i	775	2.923 g h i j k
768	3.583 g h	736	0.6388 f g h i	768	2.817 h i j k
739	3.412 h	787	0.612 g h i	739	2.668 i j k
737	3.273 h	789	0.5368 h i	737	2.585 j k
417	3.244 h	811	0.5118 i	417	2.422 k

*Las Líneas con la misma letra no son diferentes significativamente ($P < 0.05$)

Tabla 4.19 Separación de medias Duncan realizada para los DH de la población Chevron x PI383933 de la serie II para las variables número de regenerantes (NR) y número de regenerantes reales (NRReal).

Línea	NR	Línea	NRReal
741	20 a	PI	19.11 a
268	20 a	741	18 a b
847	19.95 a	847	17.19 a b c
789	19.79 a	271	17.17 a b c
PI	19.75 a	754	17.08 a b c d
768	19.69 a	268	16.52 a b c d e
271	19.67 a	791	16.08 a b c d e
791	19.66 a	435	15.65 a b c d e f
754	19.66 a	445	15.53 a b c d e f g
775	19.5 a b	823	14.4 a b c d e f g h
454	19.04 a b	417	14.19 a b c d e f g h i
445	18.87 a b	768	13.72 b c d e f g h i j
417	18.7 a b	759	13.65 b c d e f g h i j
787	18.46 a b	434	13.4 b c d e f g h i j
751	18.17 a b c	454	13.37 b c d e f g h i j
823	18.17 a b c	828	12.83 c d e f g h i j k
435	18.17 a b c	789	12.39 c d e f g h i j k
828	18.17 a b c	Ch	12.08 d e f g h i j k l
780	18.16 a b c	751	11.9 e f g h i j k l
Ch	17.66 a b c	775	10.69 f g h i j k l
273	17.54 a b c	273	10.49 g h i j k l
434	17.17 a b c	787	9.95 h i j k l
759	16.42 b c d	270	9.58 h i j k l
270	15.16 c d e	825	9.45 h i j k l
811	13.67 d e	737	9.19 i j k l
737	13.42 e	780	9.08 j k l
422	13.16 e	835	8.78 j k l
835	12.88 e	811	8.15 k l
825	12.29 e	422	7.08 l

*Las Líneas con la misma letra no son diferentes significativamente ($P < 0.05$)

Tabla 4.20 Separación de medias Duncan realizada para los DH de la población Chevron x PI383933 de la serie II para las variables: longitud total, longitud de raíz y longitud de tallo.

Línea	LT	Línea	LR	Línea	LTa
271	4.91 a	417	1.042 a	271	4.08 a
741	4.52 a b	768	0.920 a b	741	3.71 a b
417	4.48 a b	435	0.919 a b	PI	3.62 a b c
754	4.36 a b c	270	0.855 a b c	754	3.59 a b c d
PI	4.28 a b c	Ch	0.844 a b c	268	3.46 a b c d e
768	4.21 a b c	823	0.838 a b c d	417	3.44 a b c d e f
268	4.06 a b c d	791	0.831 a b c d	768	3.28 a b c d e f g
847	4.03 a b c d	271	0.830 a b c d	847	3.27 a b c d e f g
435	4.02 a b c d	741	0.803 a b c d	434	3.21 a b c d e f g
823	3.92 a b c d	754	0.783 a b c d	454	3.11 a b c d e f g h
454	3.85 a b c d e	847	0.767 a b c d	435	3.10 a b c d e f g h
434	3.82 a b c d e	454	0.747 a b c d	823	3.08 a b c d e f g h
791	3.70 a b c d e f	422	0.705 b c d	273	2.93 b c d e f g h i
273	3.57 b c d e f	737	0.693 b c d e	828	2.91 b c d e f g h i
751	3.51 b c d e f	811	0.666 b c d e	791	2.88 b c d e f g h i
Ch	3.46 b c d e f	PI	0.658 b c d e	751	2.88 b c d e f g h i
828	3.45 b c d e f	787	0.653 b c d e	445	2.82 b c d e f g h i
270	3.19 c d e f	273	0.649 b c d e	Ch	2.63 c d e f g h i
445	3.18 c d e f	780	0.639 b c d e	775	2.62 c d e f g h i
787	3.17 c d e f	751	0.636 b c d e	789	2.56 c d e f g h i
775	3.15 c d e f	434	0.609 b c d e	825	2.55 c d e f g h i
737	3.14 c d e f	268	0.592 b c d e	759	2.52 d e f g h i
825	3.12 c d e f	825	0.568 c d e	787	2.52 d e f g h i
789	3.11 c d e f	759	0.566 c d e	737	2.45 e f g h i
759	3.09 c d e f	789	0.554 c d e	811	2.42 e f g h i
422	3.08 c d e f	828	0.541 c d e	422	2.38 f g h i
811	2.86 d e f	775	0.527 c d e	270	2.35 g h i
835	2.62 e f	835	0.499 d e	835	2.12 h i
780	2.51 f	445	0.357 e	780	1.88 i

*Las Líneas con la misma letra no son diferentes significativamente ($P < 0.05$)

4.8. DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA TIPO V A FHB DE LA POBLACIÓN DH CHEVRON x PI383933

El fenotipado consistió en valorar la variación de coloración que presentaban las flores bajo tratamiento con una disolución de DON y comprobar si este tratamiento producía esterilidad.

En la Figura 4.17 vemos como las flores control (b) presentan grano frente a las tratadas. De hecho, se pueden percibir los estambres sobresaliendo. Las flores tratadas (a) son estériles y presentan un color blanco-amarillento.

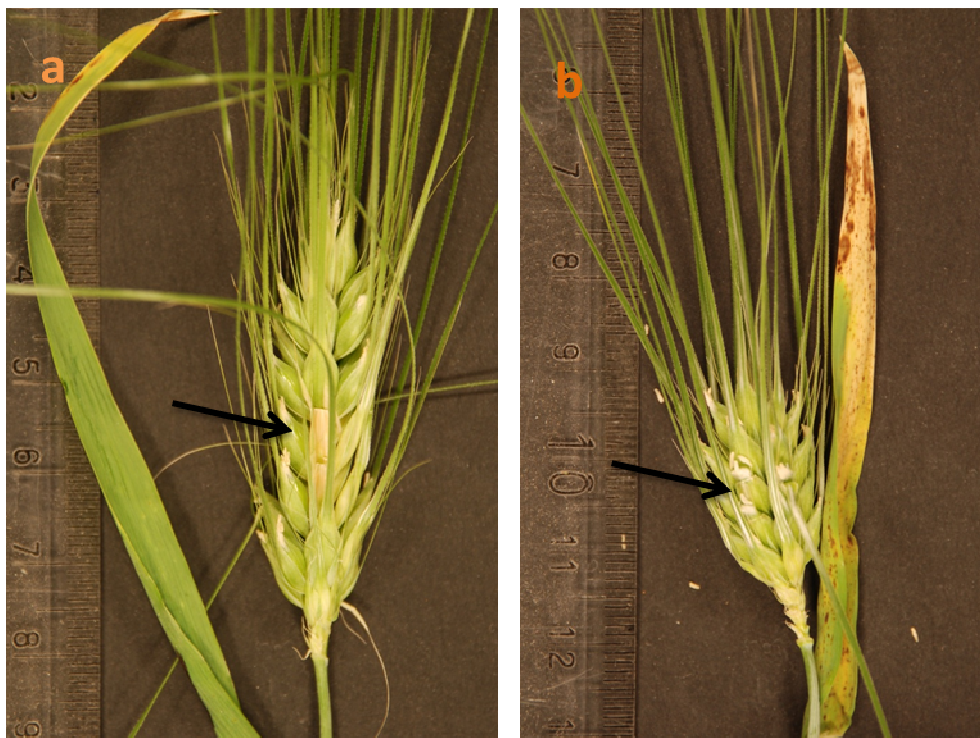


Figura 4.17 a) Espiga tratada con toxina. Se observan las dos flores tratadas en esta espiga, la 3 y 4 empezando por la base de la espiga. b) Espiga control. Se observan las flores tratadas, correspondientes a las número 2 y 3 empezando por la base de la espiga.

4.8.1. Búsqueda concentración de cribado.

Primero se determinó la concentración de DON que se debía utilizar para poder establecer diferencias entre los parentales. Para ello se realizaron dos inoculaciones en cada flor tratada mediante la inyección de una solución de DON de 0 (control), 0,63 mg/l, 1,25 mg/L o 2,5 mg/L.

Las flores control siguieron un desarrollo normal. Con el tratamiento de 0,63 mg/L se obtuvieron flores fértiles para ambos parentales, cosa que cambio para el tratamiento de 1,25 mg/L en la que Chevron resultó dañada y PI33938 conservó la fertilidad. En el tratamiento más alto ambos cultivares fueron incapaces de cuajar el grano. Estas diferencias las podemos observar en la Figura 4.18.



Figura 4.18 Búsqueda de concentración de cribado con los genotipos parentales.

4.8.2. Inoculación de toxina en flores. Fenotipado.

El siguiente paso lo constituyó tratar toda la población DH con la concentración de 1,25 mg/L, escogida por los resultados anteriores. Se esperaba un comportamiento intermedio en la población tanto para la variable color como para la esterilidad. En el caso del carácter color se establecieron seis categorías para clasificar los daños producidos por el tratamiento con toxina, que aparecen representadas por diferentes líneas DH en la Figura 4.19.

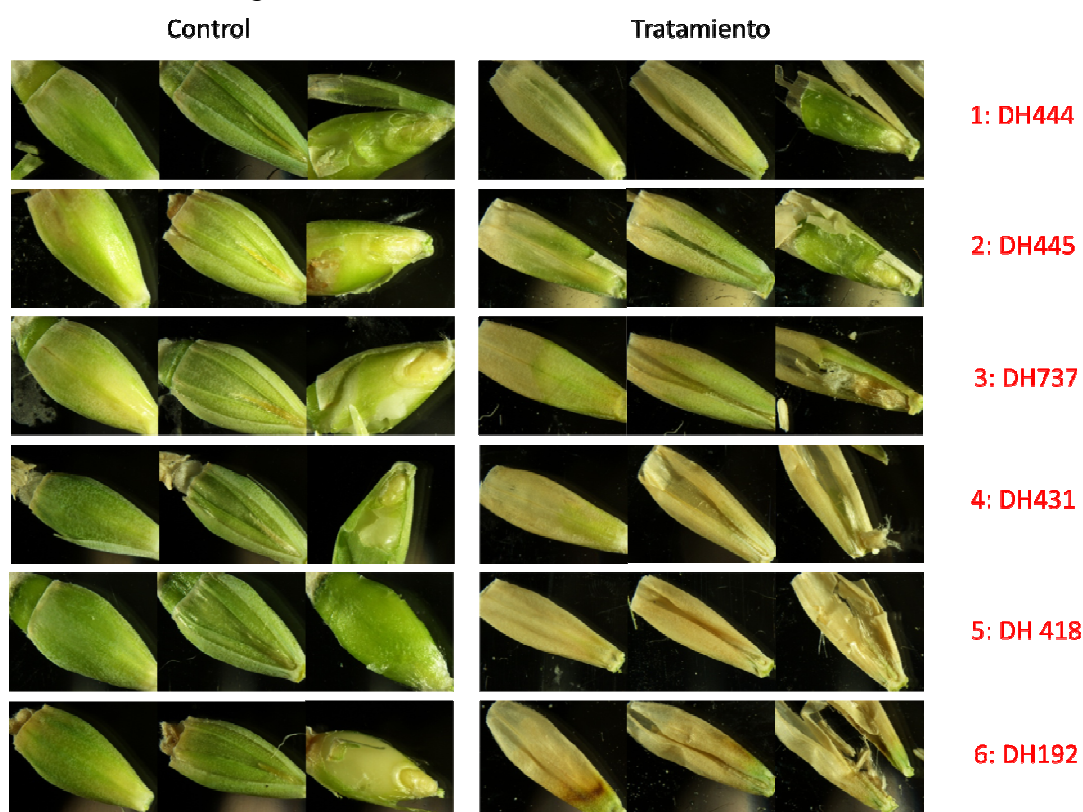


Figura 4.19. Categorías de color utilizadas para comparar las líneas bajo el tratamiento con 1,25 mg DON/L. En la columna izquierda aparece de izquierda a derecha una flor control en su vista delantera, trasera e interior. En la columna de la derecha aparece una flor tratada del mismo genotipo en su vista delantera, trasera e interior.

Estas dos variables no siguen una distribución normal. No se encontró una transformación adecuada para los datos por lo que se mantuvieron los valores iniciales y se realizó un análisis RELM para determinar si existían diferencias significativas entre las líneas, los tratamientos y su interacción. En ambos casos se hallaron diferencias significativas con un nivel de $P < 0,001$ para los tres parámetros. En el caso de la categoría de color se realizó un análisis de varianza de Kruskal-Wallis por tratarse de datos categóricos. En él también se observan diferencias significativas ($P < 0,001$) entre los tratamientos.

Las distribuciones de frecuencias del tratamiento control (datos no expuestos) mostraron que para el color únicamente aparecen las categorías 1 y 2, y que como máximo se presentó un porcentaje del 40 % de esterilidad. Para el porcentaje de esterilidad se probó a realizar una transformación logarítmica de los datos, pero al no observarse una mejor aproximación a una distribución normal se mantuvieron.

En el caso del tratamiento con toxina nos encontramos con todas las categorías de color representadas, exceptuando la 1, con una distribución un tanto sesgada hacia valores altos (Figura 4.20 A) el 75% de las líneas se encuentra distribuida entre las categorías de color 4, 5 y 6. Para la variable esterilidad (Figura 4.20 B) vemos una distribución en “forma de J”, es decir, la mayoría de las líneas (65 %) caen en el último rango (81-100 % de esterilidad).

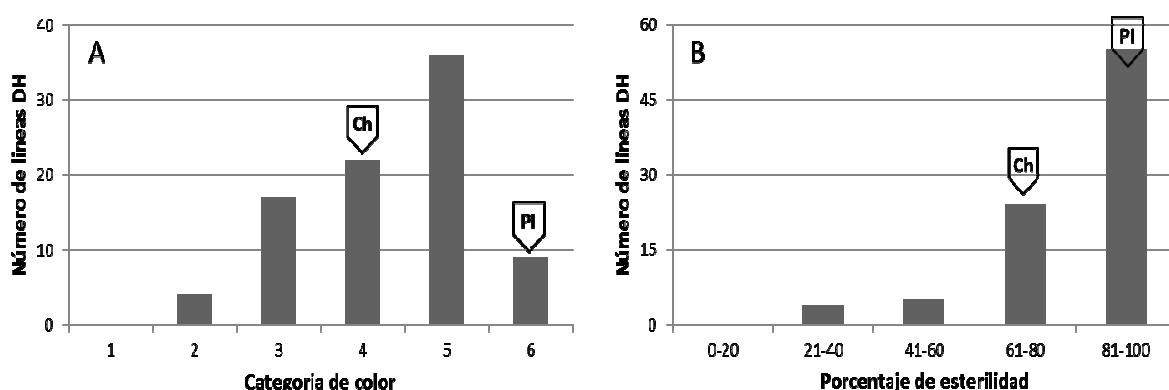


Figura 4.20 Distribución de frecuencias de las variables color y porcentaje de esterilidad de las líneas Chevron x PI383933 bajo el tratamiento con toxina. En flechas aparece el grupo al que pertenecen los parentales, Ch=Chevron y PI=PI383933.

4.8.3. Relación entre selección *in vitro* y fenotipo de la población DH Chevron x PI383933.

En este trabajo observamos las correlaciones entre las variables de selección *in vitro* con las del fenotipado. Estas correlaciones son negativas y son más altas para los parámetros de longitud. Existen correlaciones positivas altas para el número de regenerantes reales y los parámetros de fenotipado, pero menores que las de longitud.

El número de regenerantes presenta baja correlación con los datos de inoculación de DON.

Las variables de selección *in vitro* están correlacionadas entre sí, sobre todos las longitudes entre sí y con el número de regenerantes reales, ya que para entrar en esta categoría los regenerantes deben superar los 2,5cm de longitud. Es interesante ver que existe una alta correlación entre longitud total y radicular o de tallo, lo que pone de manifiesto la buena organogénesis de las plántulas.

Tabla 4.21 Correlaciones entre variables de selección *in vitro* y fenotipado.

NR	1						
NRReal	0,745	1					
LT	0,663	0,926	1				
LR	0,515	0,772	0,9	1			
LTa	0,678	0,935	0,984	0,815	1		
Color	-0,261	-0,548	-0,639	-0,689	-0,579	1	
Esterilidad	-0,437	-0,629	-0,708	-0,701	-0,67	0,692	1
	NR	NRReal	LT	LR	LTa	Color	Esterilidad

4.8.4. Caracterización morfológica de la población Chevron x PI383933

Tanto Chevron como PI383933 son cebadas de seis carreras, con aristas medias, porte erguido y grano cubierto, blanco. Los caracteres examinados fueron la altura de las plantas, el encañado, la longitud de la espiga, el número de flores por espiga y el número de granos por espiga. La distribución de frecuencias para cada variable aparece en la Figura 4.21. Observamos que todas siguen una distribución normal, que en el caso del número de cañas está sesgada hacia valores bajos. Al disponer solo del valor de uno de los parentales, no se pudo comprobar como varió la respuesta en la población (104 líneas). Sin embargo, podemos ver que el parental PI presentó, de manera general, los valores medios de la población.

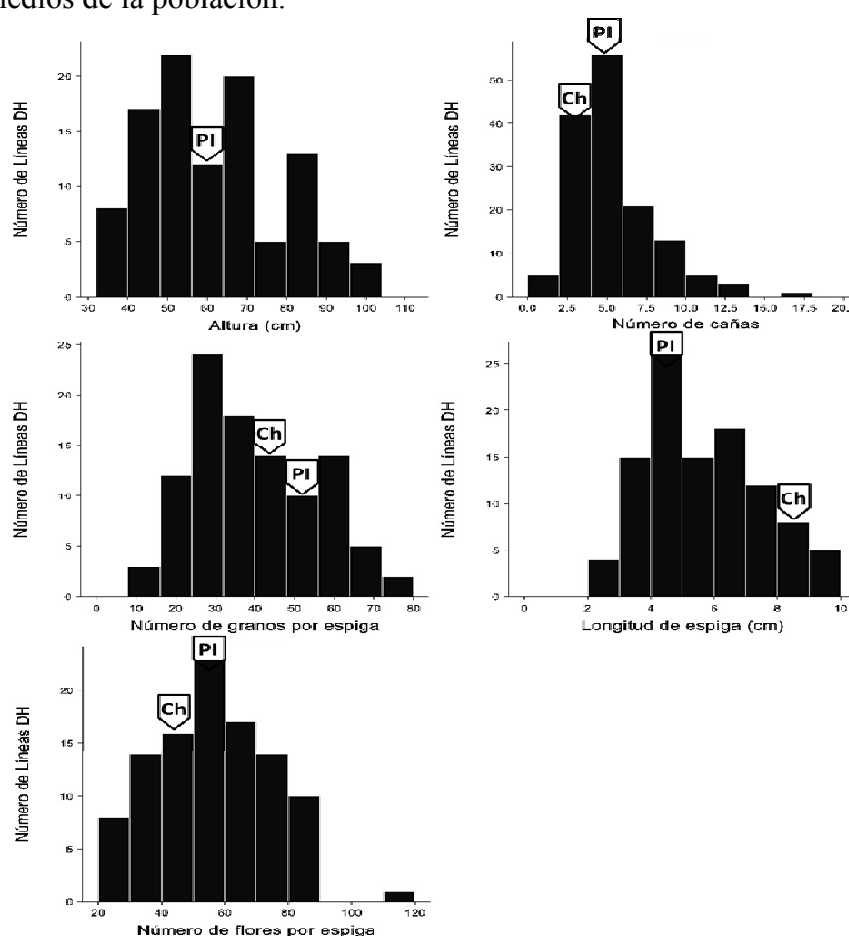


Figura 4.21. Distribución de frecuencias para los caracteres morfológicos: a) Altura de la planta, b) Número de cañas, c) Número de granos por espiga, d) Longitud de la espiga, e) Número de flores por espiga. Ch= Chevron, PI=PI383933.

4.9. GENOTIPADO DE LA POBLACIÓN DH CHEVRON x PI383933

4.9.1. SSR

- Búsqueda de polimorfismos entre parentales:

Se escogieron un total de 42 marcadores microsatélite que tienen relación con QTL's para resistencia a la fusariosis de la espiga. De todos ellos se comprobó la existencia de polimorfismo entre los parentales para un total de 22 marcadores que fueron los utilizados para genotipar la población completa.

- Genotipado de la población con los microsatélites

Muchos de los marcadores seleccionados como polimórficos entre los parentales no lo eran en la población, en la que únicamente aparecía un alelo. Esto fue debido a que Chevron no es uno de los progenitores. En total 10 fueron polimórficos en la población y fueron los que se utilizaron para integrar en el mapa.

4.9.2. DArT's

Se obtuvieron un total de 739 marcadores polimórficos para los 94 genotipos enviados a analizar (92 líneas DH y los dos parentales). Cada marcador fue nombrado según indicó la empresa "Diversity Arrays Technology Pty. Ltd." (con el prefijo "bPb" seguido de un número), y se describió el tipo de alelo como 0 o 1. Además se nos comunicó que la calidad media de los marcadores era buena y se nos sugirió la verificación de la identidad de las líneas parentales enviadas, ya que no concordaban bien con las líneas del cruce, los marcadores no las discriminaban bien.

Lo primero que se hizo fue comprobar el perfil de DArT's de ambos supuestos parentales con otro perfil de DArT's realizado previamente. No se observaron diferencias en los marcadores, es decir, que la identidad de los genotipos parentales enviados a analizar era la correcta.

Para determinar si pudo haber un problema en la producción de la población primero se comprobó si ésta provenía de un cruce biparental o existía otra estructura. Mediante el uso del software Structure (Pritchard et al., 2000) se vio que la población provenía efectivamente de un cruce biparental.

El siguiente paso fue examinar como representaba cada uno de los parentales a la población. Comprobamos que PI383933 era un parental mientras que el cultivar Chevron no.

A la vista de estos datos, se buscó en el banco de semillas de nuestro laboratorio un posible parental entre los cultivares utilizados en la época en la que se produjo la población, por si pudiese existir una equivocación en la elección del material de partida. Los cultivares incluidos en esta búsqueda fueron ejemplares de seis carreras y primaverales, ya que no se encontraron diferencias de estos hábitos en la progenie. Se consiguieron los perfiles de DArT's de cada cultivar y se cotejaron con el perfil del parental desconocido sin llegar a ningún emparejamiento positivo.

4.10. MAPEO DE LA POBLACIÓN DH CHEVRON x PI383933

El análisis de ligamiento de los marcadores fue realizado con el programa Joinmap 4.0[®] (Van Ooijen, 2006). Se establecieron los parámetros de LOD independiente (*independence LOD*) para la probabilidad de asignación de cada marcador a cada grupo de ligamiento. El cálculo de distancias y el orden de los

diferentes marcadores fueron realizados mediante el método de máxima verosimilitud (ML, Maximum Likelihood)

Para alguno de los marcadores la propia empresa indica la posición más plausible. A partir de estos datos se construyó el mapa de ligamiento incrementando el mapa con el resto de marcadores DArT no posicionados. No se consiguió integrar en el mapa ninguno de los 10 marcadores SSR genotipados.

La empresa Triticarte Pty. Ltd nos envió un total de 739 DArT's polimórficos para 92 líneas DH y las dos variedades PI383933 y Chevron. De todos estos marcadores finalmente se colocaron 442 en los mapas de ligamiento.

Los mapas consistieron en un total 442 marcadores distribuidos en 12 grupos de ligamiento asignados a los siete cromosomas de cebada. Cubren una distancia de 1071,5 cM con una densidad media de 2.419 cM de distancia entre marcadores. El criterio de selección del ligamiento de los distintos marcadores dentro de cada grupo de ligamiento se mantuvo estricto, con un LOD mínimo de 9. Aquellos cromosomas en los que se encontraron dos grupos de ligamiento se designaron con el nombre del cromosoma y una letra. Las distribuciones de los marcadores en cada grupo de ligamiento aparecen en la Tabla 4.22.

Tabla 4.22 Distribución de marcadores en cada grupo de ligamiento: Número de marcadores, distancia que cubren en el mapa y distancia media de separación entre ellos para cada Grupo de ligamiento

Grupos de ligamiento	Marcadores	Distancia media entre marcadores (cM)	Distancia que cubren (cM)	Intervalo más grande "gap" (cM)
1H	57	3.30	188.38	22.45
2HA	42	2.77	116.41	10.68
2HB	31	1.85	57.43	17.68
3HA	37	2.81	104.04	20.03
3HB	32	2.78	89.14	24.14
4H	26	2.78	72.33	10.63
5HA	32	2.41	77.38	22.45
5HB	45	2.61	117.66	13.33
6HA	40	2.29	91.78	20.81
6HB	15	2.61	39.18	14.74
7HA	44	1.20	53.14	12.12
7HB	41	1.57	64.59	11.78

La representación grafica de los mapas de ligamiento y la posición de cada marcador (cM) aparecen en la.Figura 4.22.

4. Resultados

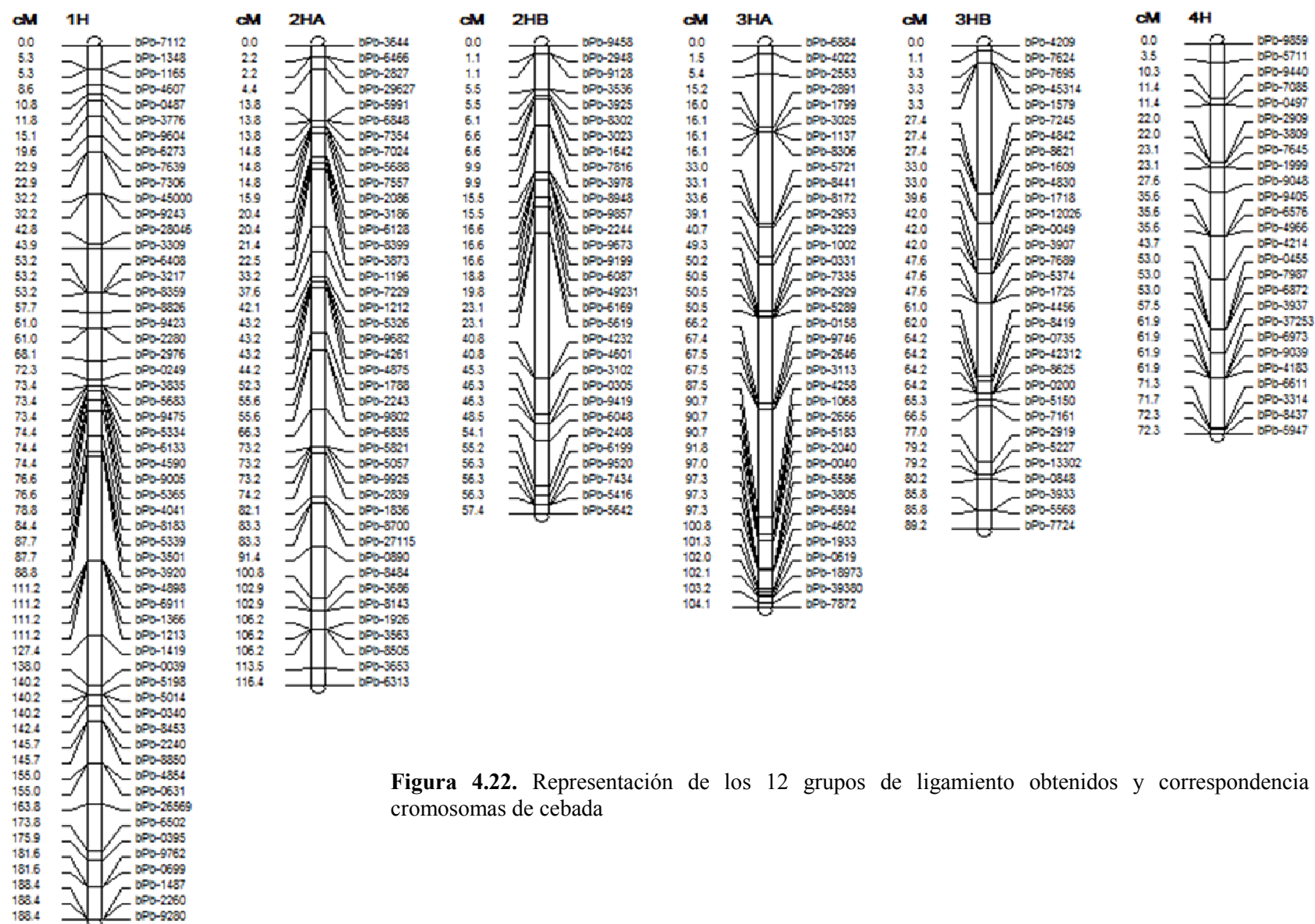


Figura 4.22. Representación de los 12 grupos de ligamiento obtenidos y correspondencia con los cromosomas de cebada

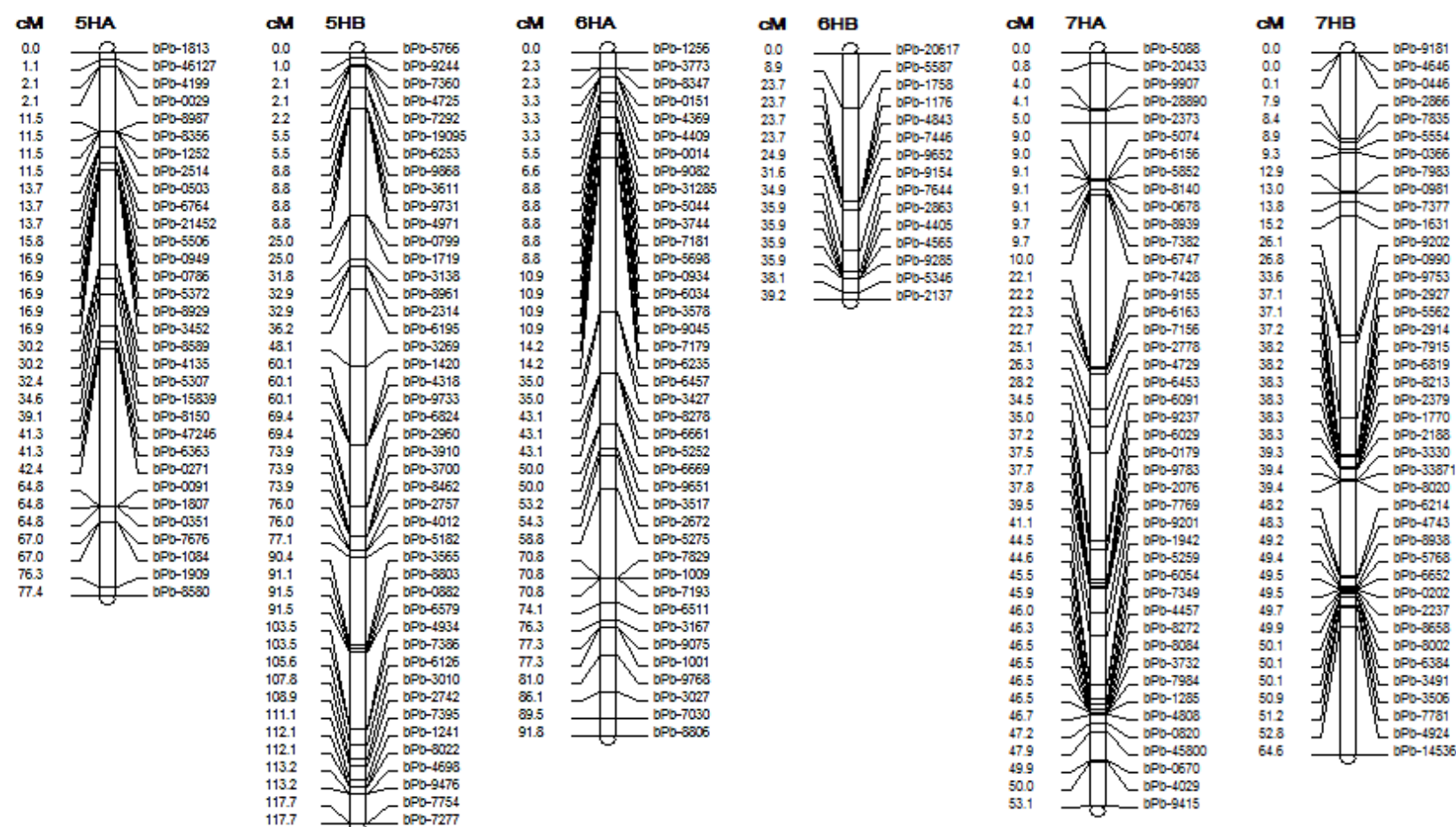


Figura 4.22. Representación de los 12 grupos de ligamiento obtenidos y correspondencia con los cromosomas de cebada. *Continuación.*

4.11. BÚSQUEDA DE QTL'S EN LA POBLACIÓN DH CHEVRON x PI383933

La búsqueda de QTL's se realizó siguiendo el método de “*Composite interval mapping*” para datos cuantitativos, y el método de “*Interval Mappig*” para datos categóricos, que contiene el programa Windows QTL Cartographer (Wang S. et al., 2012).

En la Tabla 4.23 vemos un resumen de los QTL's indicando el carácter con el que está asociado, la posición, su efecto y marcador asociado.

En la Figura 4.23 aparecen los grupos de ligamiento con los QTL detectados.

Tabla 4.23 QTL's detectados en cada cromosoma, posición, marcador asociado, efecto aditivo e intervalo

Carácter	Grupo de ligamiento [≈]	Posición QTL		LOD	Efecto aditivo	2-LOD Intervalo de confianza		LOD threshold
			Marcador asociado			LOD2- left2	right2	
Esterilidad Serie I	2 (2HA)	103.0	bPb-3686 bPb-8143	3,1	10.821	91.4	113.4	3,0
Esterilidad Serie II	1 (1H)	8.6	bPb-4607	5,6	-15.098	5.6	13.2	3,2
	9 (6HA)	2.3	bPb-3773	3,8	18.188	0.0	8.6	3,2
			bPb-8347					
NR Serie I	9 (6HA)	11.0	bPb-0934 bPb-6034 bPb-3578 bPb-9045	5,9	-0.688	10.8	30.3	4,0
NR Serie II	9 (6HA)	2.3	bPb-3773 bPb-8347	3,9	-1.845	0.0	10.8	3,1
NRReal Serie I	2 (2HA)	79.2	bPb-2839* bPb-1836*	4,1	2.994	74.2	82.1	3,1
	2 (2HA)	87.4	bPb-27115* bPb-0890*	4,3	3.006	18.5	41.3	3,1
NRReal Serie II	9 (6HA)	35.1	bPb-6457 bPb-3427	6,1	-3.647	66.4	85.3	3,3
	12 (7HB)	12.9	bPb-7983 bPb-0981	3,7	-2.876	10.1	14.8	3,3
	12 (7HB)	18.2	bPb-1631* bPb-9202*	4,8	-2.892	15.2	25.2	3,3
LT Serie I	2 (2HA)	91.4	bPb-0890	5,6	0.614	84.2	98.8	3,0
	3 (2HB)	18.8	bPb-6087	6,4	-1.051	16.5	22.8	3,0
	8 (5HB)	36.2	bPb-6195	3,2	-0.314	33.0	48.1	3,0

Continúa

(Continuación)

LT Serie I	10 (6HB)	23.7	bPb-1758 bPb-1176 bPb-4843 bPb-7446	4,6	0.801	10.5	24.9	3,0
LT Serie II	11 (7HA)	47.3	bPb-0820	6,4	-1.058	46.7	48.7	3,0
	5 (3HB)	27.4	bPb-7245 bPb-4842 bPb-8621	4,5	0.524	3.3	39.1	3,1
	7 (5HA)	64.8	bPb-0091 bPb-1807 bPb-0351	4,5	-0.548	45.1	67.0	3,1
LTa Serie I	2 (2HA)	91.4	bPb-0890	4,7	0.623	85.9	99.0	2,8
	3 (2HB)	15.5	bPb-8948 bPb-9857	2,9	-0.422	10.7	22.4	2,8
	11 (7HA)	4.0	bPb-9907 bPb-28890	2,9	-0.564	1.3	8.8	2,8
LTa Serie II	5 (3HB)	27.4	bPb-7245 bPb-4842 bPb-8621	4,4,	0.401	4.9	32.5	
	7 (5HA)	64.8	bPb-0091 bPb-1807 bPb-0351	5,4	-0.490	53.9	66.7	
	9(6HA)	35.1	bPb-6457 bPb-3427	3,2	-0.327	20.7	42.6	
LR Serie I	1 (1H)	127.4	bPb-1419	5,8	-0.233	118.6	135.6	2,9
	9 (6HA)	43.1	bPb-8278 bPb-6661 bPb-5252	3,7	-0.151	35.9	50.0	2,9
	11 (7HA)	25.1	bPb-2778	4,9	-0.198	21.1	30.4	2,9

Continúa

4. Resultados

(Continuación)

Altura Serie I	2 (2HA)	35.2	bPb-1196 bPb-7229*	5,0	8.899	24.2	44.2	2,8
	5 (3HB)	2.1	bPb-7624 bPb-7695*	4,5	-8.497	0.0	20.4	2,8
	11 (7HA)	37.7	bPb-9783 bPb-2076	3,7	7.534	26.3	46.7	2,8
Altura Serie II	4 (3HA)	5.4	bPb-2553	6,5	-7.912	1.8	15.0	2,9
	7 (5HA)	34.6	bPb-15839	4,1	-5.283	18.8	38.7	2,9
	12 (7HB)	48.2	bPb-6214	3,7	-4.783	39.4	49.3	2,9
Cañas Serie II	1 (1H)	171.8	bPb-6502		0.844	164.5	180.4	
	2 (2HA)	55.6	bPb-2243 bPb-9802		-2.954	55.3	65.7	
	10 (6HB)	0.0	bPb-20617		2.752	0.0	8.0	
	10 (6HB)	13.9	bPb-5587		2.752	10.0	23.0	
	11 (7HA)	37.7	bPb-9783 bPb-2076		-1.500	29.6	43.7	
LEsp Serie I	2 (2HA)	33.2	bPb-1196	11,7	1.335	24.9	43.1	3,5
	11 (7HA)	36.0	bPb-9237* bPb-6029*	5,4	0.651	26.3	42.7	3,5
	12 (7HB)	49.3	bPb-8938 bPb-5768	5,4	0.728	38.3	50.2	3,5
LEsp Serie II	2 (2HA)	2.2	bPb-6466 bPb-2827	9,3	1.097	0.0	12.7	
	4 (3HA)	40.7	bPb-3229	8,4	-0.851	39.2	49.0	
	7 (5HA)	72.0	bPb-1084* bPb-1909*	4,5	-0.555	66.9	76.3	

Continúa

<i>Continuacion</i>	12 (7HB)	38.3	bPb-8213 bPb-2379 bPb-1770 bPb-2188	7,7	1.674	29.6	41.2	2,9
	12 (7HB)	49.3	bPb-8938 bPb-5768	6,3	-1.118	49.1	50.3	
N° flores Serie I	2 (2HA)	33.2	bPb-1196	9,9	12.687	24.9	43.1	3,1
	10 (6HB)	23.7	bPb-1758 bPb-1176 bPb-4843 bPb-7446	3,9	-6.684	8.8	34.7	3,1
	11 (7HA)	18.0	bPb-6747* bPb-7428*	4,0	-5.821	10.7	22.1	3,1
	11 (7HA)	37.7	bPb-9783 bPb-2076	6,9	11.160	29.6	40.9	3,1
N° flores Serie II	1 (1H)	140.2	bPb-5198 bPb-5014 bPb-0340	4,5	-7.212	127.8	145.7	3,1
	2 (2HA)	20.4	bPb-3186 bPb-6128	5,2	9.002	9.9	22.5	3,1
	4 (3HA)	33.0	bPb-8441	6,7	-10.348	19.6	38.9	3,1
N°granos/espiga Serie I	2 (2HA)	33.2	bPb-1196	7,7	8.455	23.4	43.1	3,2
	8 (5HB)	32.9	bPb-8961 bPb-2314	4,0	5.442	25.0	47.4	3,2
N°Granos/espiga Serie II	3 (2HB)	50.5	bPb-6048* bPb-2408*		-5.441	46.3	55.1	
	7 (5HA)	67.0	bPb-7676 bPb-1084		-4.440	61.8	75.7	
	8 (5HB)	63.1	bPb-9733* bPb-6824*		-5.107	48.5	70.9	

LOD basados en 500 permutaciones, 10 cM de ventana y 0,5% de porcentaje de error de tipo I.

≈ Grupo de ligamiento: entre paréntesis grupo de ligamiento definido en este trabajo

*Marcadores flanqueantes del QTL.

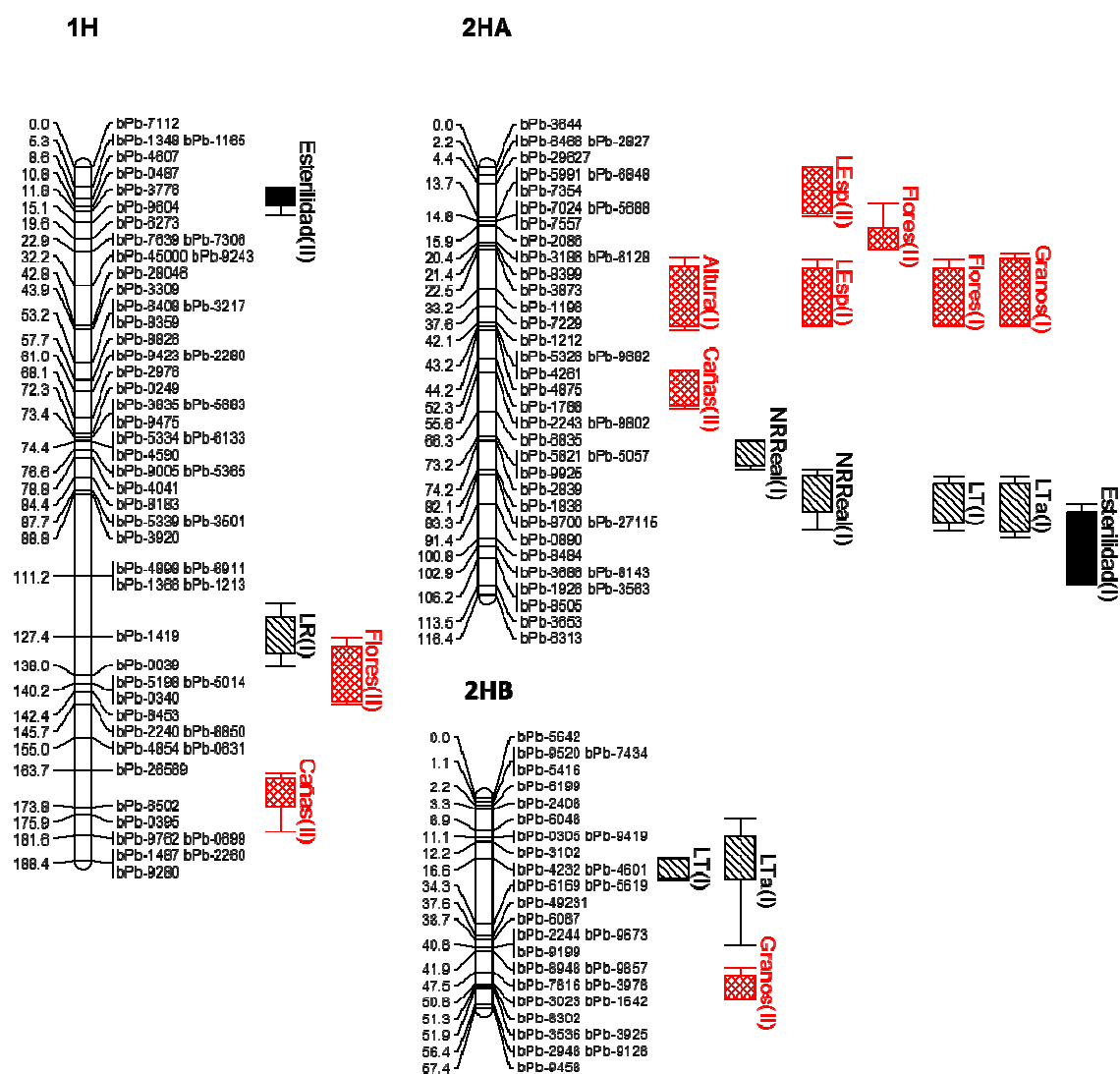


Figura 4.23 Disposición de los QTL detectados en los diferentes grupos de ligamiento. Con cuadrícula rayada los QTL relacionados con la selección *in vitro*, con cuadrícula a rombos los QTL relacionados con la morfología de las plantas, y en cuadrícula negra los relacionados con los caracteres de fenotipado de inoculación de DON en la flor.

Continúa

Continuación

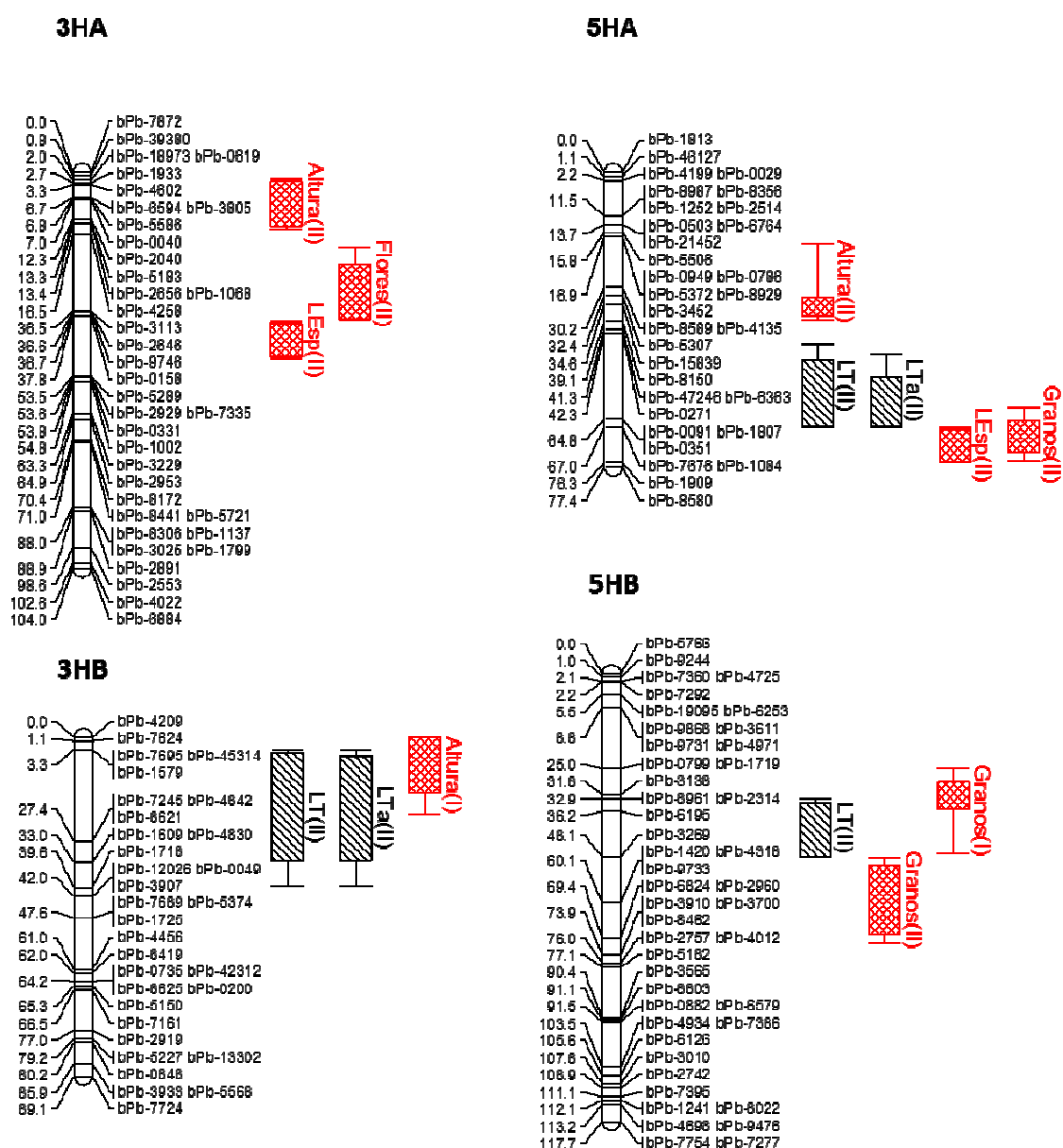


Figura 4.23. Disposición de los QTL detectados en los diferentes grupos de ligamiento. Con cuadrícula rayada los QTL relacionados con la selección *in vitro*, con cuadrícula a rombos los QTL relacionados con la morfología de las plantas, y en cuadrícula negra los relacionados con los caracteres de fenotipado de inoculación de DON en la flor. (Continuación.)

Continúa

Continuación

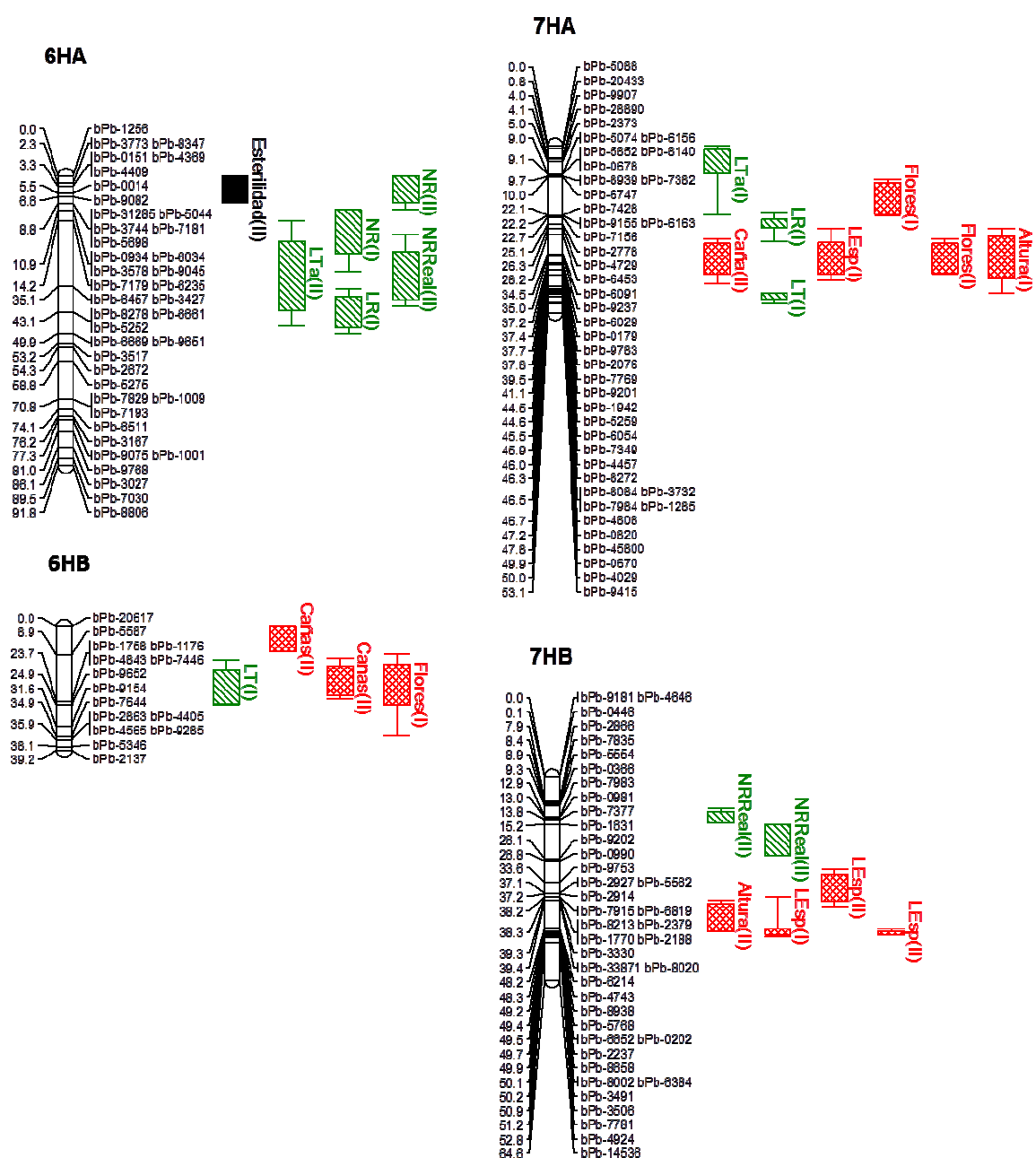


Figura 4.23. Disposición de los QTL detectados en los diferentes grupos de ligamiento. Con cuadrícula rayada los QTL relacionados con la selección *in vitro*, con cuadrícula a rombos los QTL relacionados con la morfología de las plantas, y en cuadrícula negra los relacionados con los caracteres de fenotipado de inoculación de DON en la flor (Continuación.)

4.11.1. QTL'S asociados a los caracteres fenotipado por inoculación con toxina

- **Color (decoloración de la flor)**

No se obtuvieron QTL's significativos para el carácter cualitativo "color" (ensayo de fenotipado).

- **Esterilidad de la flor**

Los tres QTL's identificados (uno en la serie I y dos en la serie II) no coinciden en su localización. Recayeron sobre los cromosomas 2HA, 1H y 6HA, respectivamente.

4.11.2. QTL'S asociados a los caracteres de selección *in vitro*

Para estos caracteres utilizamos dos subpoblaciones: la dos series en las que se dividió el trabajo de selección *in vitro*, la Serie I y la Serie II.

- **Número de regenerantes**

Se obtuvieron dos QTL's en el grupo de ligamiento 6HA, uno en cada serie, que coinciden en su posición, ambos con un efecto aditivo negativo.

- **Número de regenerantes reales**

Encontramos dos QTL's para la Serie I en el cromosoma 2HA, ambos con efectos aditivos positivos. Para la Serie II obtuvimos tres QTL's, uno en el grupo de ligamiento 6HA y los otros dos en el 7HB.

- **Longitud total, de tallo y radicular de plántulas**

Los QTL's encontrados para los caracteres de longitud determinada en selección *in vitro* no coincidieron entre series.

Los QTL LT (I).2HA y LT(I).2HB comparten localización con los de LTa(I).2HA y LTa(I).2HB. Lo mismo sucedió con los QTL LT(II).3HB y LT(II).5HA con los LTa(II).3HB y LTa(II).5HA. Y también con los QTL's LTa(II).7HA y LR(II).7HA

4.11.3. QTL'S asociados a los caracteres morfológicos

Los QTL's Altura (I), LEsp (I), N° flores (I), Granos(I) coincidieron alrededor de la posición 33 del grupo de ligamiento 2HA.

Los LEsp (II) y Granos (II) también coincidieron en el cromosoma 5HA.

Los QTL's de Altura (I) , Cañas (II), LEsp (I) y N° flores (I) fueron localizados en el cromosoma 7HA alrededor de los 38 cM.

Por ultimo, es remarcable la coincidencia de los QTL's LEsp (I), LEsp Serie (II) y Altura (II) el cromosoma 7HB en posición 43cM.

El resto de QTL's resultaron ser únicos, no coincidentes con cualquier otro de la misma categoría.

5.DISCUSIÓN

DICUSIÓN

5.1. PRODUCCIÓN DE LA POBLACIÓN DH SAHARA x CLIPPER

Entre las técnicas de producción de DH la androgénesis es un método comúnmente utilizado debido a la posibilidad de producción de un gran número de individuos DH a partir de unas pocas anteras (Touraev et al., 2001). La androgénesis permite tanto la fijación de caracteres en líneas seleccionadas al final del proceso de mejora como la obtención de homocigotos en poblaciones segregantes para ampliar las combinaciones génicas y generar nueva variabilidad. Hay estudios que señalan que el cambio del desarrollo gametofítico a un desarrollo esporofítico está controlado por genes (Chen, 1977; Barnabás et al., 1999; Obert and Barnabás, 2004). Beaumont, et al, (1995) identificaron seis regiones cromosómicas que están asociadas con la capacidad de inducir estructuras de tipo embrionario a partir de microsporas durante la androgénesis en maíz.

Un genotipo recalcitrante es aquel que no presenta una buena aptitud para el cultivo *in vitro*, bien sea en una de sus fases o en todas, y por ello no genera o produce pocos callos (en muchos casos friables), embriones y finalmente plantas verdes. Según los resultados obtenidos para el cultivo de microsporas de Clipper y Sahara se ha definido a Clipper como un cultivar que responde y a Sahara como recalcitrante debido al problema del alto porcentaje de plantas albinas que produce.

El albinismo está asociado a la degeneración el DNA plastidial durante el desarrollo temprano del polen en su cambio hacia embriogénesis impidiendo que se desarrollen cloroplastos (Careda et al., 2000). Existen modificaciones en el medio de cultivo que ayudan a prevenir este problema como la utilización de manitol en el medio de pretratamiento (Careda et al., 1999), melibiosa (Sorvari and Schieder, 1987) o sulfato de cobre (Jacquard et al., 2009), que se podrían probar con el cultivar Sahara. También se han identificado regiones del genoma implicada en el albinismo (Chen et al., 2007; Muñoz-Amatriain et al., 2009). Sin embargo, actualmente el albinismo sigue consistiendo en un gran cuello de botella en la producción de cereales mediante cultivo *in vitro*.

Hanzel et al. (1985) expusieron la ventaja de las variedades de cebada de dos carreras frente a las de seis. Este hecho, aunque coherente con los resultados obtenidos (Clipper es de dos carreras mientras que Sahara es de seis), se ha contrastado en estudios posteriores probando con un mayor número de cultivares, sin encontrarse diferencias significativas para el número de embriones y plantas regeneradas (Rikiiski and Yasuda, 1994; Castillo et al., 1998).

Atendiendo a los cruzamientos no se observaron diferencias en la direccionalidad de éstos, aunque sí una “tendencia” de cada uno de ellos a parecerse a los valores del parental femenino. Este hecho podría estar relacionado con efectos maternos (Ou et al., 1989; Sági and Barnabás, 1989). Tanto la formación de embriones como el porcentaje de plantas verdes se vieron fuertemente afectados por los efectos del genotipo, algo ya conocido, y que Larsen (Larsen, 1991) cuantificó de manera general en una variación dependiente de genotipo de un 62 % y un 76 %, respectivamente..

En cuanto a la segregación de las variables de cultivo *in vitro* se observó que, la población DH Sahara x Clipper siguió un comportamiento intermedio entre los dos parentales, a excepción del porcentaje de embriones. Esto está de acuerdo con diversos trabajos donde se comprueba la heredabilidad y habilidad combinatoria de los factores de cultivo de anteras (Larsen, 1991; Hou et al., 1994; Bruins and Snijders, 1995).

En general, el cultivo de anteras se ha preferido al de microsporas para la producción de DH's en cebada. La bibliografía al respecto es controvertida y se han hecho numerosos estudios donde se detalla la mayor producción de plantas verdes en el cultivo de anteras respecto al de microsporas y viceversa (Li and Devaux, 2003; Li and Devaux, 2005). Algunos trabajos sobre cultivo de microsporas muestran mayores eficiencias respecto al cultivo de anteras (Hoekstra et al. 1992; Kasha et al. 2001). En nuestro grupo se considera de manera general que el cultivo de anteras resulta más eficaz y se utiliza rutinariamente en los casos en los que no se dispone de información sobre el comportamiento *in vitro* de los genotipos o cuando se sabe que son recalcitrantes. En este trabajo, del cruzamiento de Clipper x Sahara hemos conseguido 27 plantas verdes por cada 100 anteras en cultivo de microsporas frente a 35 en el cultivo de anteras. Aunque ambos valores son buenos, se recomendaría el cultivo de anteras para la producción de DH de estos genotipos, ya que es un método más sencillo y que conlleva menos pérdida de material en caso de contaminaciones.

Finalmente recalcar que se seleccionó la población DH SxC con un total de 123 líneas DH para todos los análisis de este proyecto porque:

- Manejar toda la población (455 líneas DH) hubiera sido imposible por cuestiones de espacio y personal.
- El parental femenino fue el cultivar Sahara, y por tanto se cabría esperar obtener un mayor número de resistentes *in vitro*. A diferencia de un programa de mejora no buscamos buenos caracteres agronómicos con resistencia, sino una resistencia incrementada.
- Existe una distorsión de la segregación para el número de carreras en el cruzamiento CxS. Podría deberse a una mayor permisividad (facilidad de cultivo) heredada de forma citoplasmática. En todo caso, al no saber la naturaleza de esta distorsión, los individuos utilizados para este proyecto han sido las líneas de la población DH SxC.

5.2. PRODUCCIÓN POBLACIÓN DH CHEVRON x PI383933

Chevron es un cultivar de seis carreras procedente de Suiza. Presenta características agronómicas como: plantas altas, espigado tardío, espigas delgadas y poco productivas. Sin embargo se suele usar en programas de mejora debido a su gran resistencia a FHB, baja acumulación de DON y a la decoloración de la espiga (De La Pena et al., 1999).

PI383933 “Kanto Nijo2” proviene del cruce Ko.1018 x Kyoto Nakate producida en Tochigi, Japón. Presenta una gran susceptibilidad a FHB, es una cebada de seis carreras, primaveral, con una altura de 44 cm, longitud de espiga de 3,6 cm (USDA, 2006) y alta acumulación de DON (Nesvadba et al., 2006).

Podemos considerar ambos genotipos como recalcitrantes debido a la baja producción de plantas verdes, solo dos por cada 100 anteras sembradas para el cultivo de anteras.

Respecto a cada cultivar por separado, PI383933 tuvo mejor aptitud para el cultivo de anteras que Chevron, ya que presentó un 38 % de producción de plantas verdes frente al 17 % de Chevron. Podríamos pensar que Chevron compensó este problema con una mayor producción de embriones, pero como también presentó una alta tasa de plantas albinas, en términos generales no supuso una mejora.

Sobre qué técnica androgénica utilizar, se puede decir lo mismo que en la discusión de la sección de boro, existen muchas opiniones contrapuestas. El cultivo de

anteras en la población Chevron x PI383933 fue claramente superior al cultivo de microsporas respecto a todos los parámetros medidos, con la única excepción del porcentaje de embriones.

En esta población, mediante cultivo de anteras se obtuvieron 27 plantas verdes/100 anteras mientras que con el cultivo de microsporas se obtuvieron 6. Por tanto resultó más eficaz el cultivo de anteras. A la vista de los resultados obtenidos hasta el momento solo se puede concluir que su eficacia es completamente dependiente de genotipo, y que resulta más eficaz el cultivo de anteras en genotipos recalcitrantes.

Nos llamó la atención que la población no mostrase unos valores intermedios para las variables medidas respecto a Chevron y PI383933. Como hemos comentado en los resultados de genotipado, Chevron no es un parental de nuestra población, por lo que es normal que no se correspondan los valores.

5.3. SELECCIÓN *IN VITRO* DE LA POBLACIÓN DH SAHARA x CLIPPER

5.3.1. Búsqueda de la concentración de cribado

La respuesta general de los cuatro genotipos testados (Sahara, Clipper, Albace e Igri) a la aplicación de una concentración alta de boro en el medio de regeneración fue un efecto inhibitorio, tanto de la regeneración como del crecimiento de las plántulas, que se hizo más obvio a medida que aumentaba la concentración de boro.

La diferencia entre los genotipos se pudo comprobar a simple vista observando las placas de regeneración, y resultó coherente con las referencias que tenemos de su comportamiento en campo, es decir: Sahara tolerante a la toxicidad por boro y Clipper e Igri sensibles. Para Albacete no se encontraron referencias bibliográficas al respecto.

Albacete es un conocido cultivar español resistente a sequía. Se testó en este proyecto en un primer momento ya que se podría considerar que algunas de las variedades resistentes a la toxicidad por boro también lo podían ser a la sequía debido a la adaptación edáfica a la que ha llevado la evolución desde el Creciente Fértil, punto de diversificación de la cebada doméstica. Sin embargo, las variedades europeas suelen presentar una mayor efectividad de extracción de boro ya que en estas regiones son deficientes en este elemento, y por tanto se producen genotipos más susceptibles a boro (Yau, 2002). Este, consideramos, fue el caso de Albacete, que a pesar de tener un alto índice de resistencia a sequía, presentó unos valores de resistencia a boro parecidos a los de Clipper e Igri.

En el caso de Sahara observamos que hasta la concentración 20 mM la raíz experimentó un gran crecimiento para luego caer a niveles parecidos a los de los otros genotipos, aunque significativamente diferentes. Este tipo de curva se ha descrito para el mismo genotipo en un trabajo de Choi (2007), donde el crecimiento de las raíces de Sahara y otro genotipo tolerante aumentaba en condiciones de exceso de boro comparado con condiciones normales, mientras que el de Clipper disminuía. Chantachume et al. (1995) y Campbell et al. (1998) también describieron la longitud de las raíces como método de selección de plántulas de trigo tolerantes a boro en cultivo hidropónico, donde encontraron efectos similares en los genotipos tolerantes.

Sahara también presentó diferencias significativas respecto al resto de genotipos en las otras variables medidas (numero de regenerantes real, longitud total y de tallo), presentando medias más altas. Estas diferencias fueron más resaltantes en la concentración más alta, 40 mM, ya que todos los parámetros medidos presentaron valores más bajos en Clipper. En el resto de concentraciones pueden o no existir

diferencias significativas entre Sahara y Clipper, o bien los valores de Clipper son mayores debido a su gran aptitud para cultivo *in vitro*.

Con estos datos la concentración que parecía más adecuada para la realización de un cribado de las líneas DH SxC en medio selectivo para la obtención de material tolerante *in vitro* fue la concentración de boro 40 mM, ya que el genotipo tolerante presentó una buena regeneración y crecimiento mientras que el sensible no. Puesto que en los sistemas de cultivo *in vitro* es muy importante el estado del material vegetal de origen, para evitar problemas al aplicar una concentración letal, se decidió utilizar también la concentración 30 mM, subletal.

Por último, en la comprobación de la capacidad de enraizamiento de las plántulas sometidas a estrés se utilizaron dos aproximaciones: una en la que se mantuvo una pequeña presión de selección (medio con boro 10 mM) y otra en la se traspasaron a medio de enraizamiento normal. Los síntomas que presentaron las plántulas bajo estrés son idénticos a los descritos en otros trabajos sobre el tema (Riley, 1987; Nable, 1988; Nable et al., 1997): clorosis, disminución del área foliar, disminución del crecimiento, necrosis, etc. Los resultados de este trabajo mostraron que la exposición a boro en la etapa de regeneración inhibió la capacidad de enraizamiento de Clipper y disminuyó la de Sahara. Por tanto la recuperación de plántulas a las que se le ha aplicado el estrés fue solo posible en el caso de contar con genotipos tolerantes.

5.3.2. Selección *in vitro* y relación con los marcadores moleculares

En las últimas décadas, la selección *in vitro* de células y tejidos se ha convertido en una herramienta importante en la biología vegetal (Palmer et al., 2005). Muchas publicaciones recientes han informado sobre la existencia de correlación entre las respuestas *in vitro* y la expresión de rasgos agronómicos deseables en campo, alcanzando los mejores resultados en proyectos para la resistencia a enfermedades, tolerancia a los herbicidas, metales, sal y bajas temperaturas (Ye et al., 1987; Vidhyasekaran et al., 1990; Pofelis et al., 1992; Bajaj et al., 1994; FAO, 2004; Rai et al., 2011).

La discriminación de genotipos de cereales tolerantes y sensibles a boro se ha llevado a cabo tradicionalmente mediante ensayos con plántulas, tanto en campo, cultivo hidropónico como en maceta. Existen pocas referencias de selección *in vitro* para estrés por toxicidad de boro (Jenkin et al., 1993; Eglinton et al., 2004). En este trabajo las diferencias entre el genotipo tolerante y sensible en cultivo *in vitro* son evidentes como demuestran las imágenes de las placas Petri y las distribuciones de frecuencias observadas. El hallazgo de diferencias significativas entre tratamientos y líneas indica la posibilidad de utilizar este método para la selección *in vitro* de tolerancia a boro.

Como hemos comentado en el apartado anterior, lo primero que se observó fue que el genotipo Sahara presentó mayor tolerancia *in vitro* a boro que Clipper, concordando con los datos de tolerancia general de los cultivares. Se observó como a altas concentraciones de boro los embriones inmaduros de Clipper eran incapaces de crecer en el medio, a diferencia de lo que sucedió con Sahara. A concentraciones inferiores ambos cultivares se vieron afectados, aunque siguió siendo Clipper el más susceptible, disminuyendo su área foliar, estrechándose el limbo, y disminuyendo su desarrollo. Estos resultados son similares a los obtenidos por Smith et al. (1985) en cultivos de callos en medio con un exceso de NaCl.

Además, aquellas líneas DH que presentaron un genotipo más cercano a Sahara presentaron un comportamiento tolerante en cultivo *in vitro* bajo una presión de selección fuerte.

La elección de los microsatélites testados fue realizada por su asociación a QTL's relacionados con la expresión de tolerancia a la toxicidad por boro. Jefferies et al (1999) establecieron que el QTL del cromosoma 2H estaba asociado a la expresión de síntomas foliares, el del 3H con la disminución del crecimiento radicular en condiciones de toxicidad, el del 4H con la absorción de boro, respuesta del crecimiento radicular, producción de materia seca, y expresión de síntomas foliares, y por último, el QTL del cromosoma 6H, se relacionó con la concentración de boro en tallo. Los tres primeros loci fueron validados en varios trabajos (Jefferies et al., 2000; Karakousis et al., 2003; McDonald et al., 2009). El locus del 6H no fue genotipado en este trabajo por la falta de un marcador tipo microsatélite que lo definiese de manera contrastada.

El uso de sólo tres marcadores para determinar el genotipo de los tres QTL's resultó suficiente para nuestro estudio. Emebiri et al. (2009) confirmaron con su trabajo sobre la detección de la introgresión del alelo de Sahara en EBmac679 en una población de backcross que el uso de un único marcador, en lugar de la utilización de marcadores flanqueantes, es rentable si se limita el número de recombinaciones. La población de DH utilizada en el presente estudio reúne estas condiciones, donde la tasa esperada de recombinación por cromosoma presenta un rango entre 1,047 (Devaux et al., 1995) y 1,78 (Cistué et al., 2011). Además, se ha demostrado que marcadores de diagnóstico ubicados cerca del intervalo de confianza de los QTL's también son efectivos en probar la transferencia del segmento del QTL (Thabuis et al., 2004).

Se encontraron interacciones significativas entre el tratamiento, los tres loci y cada variable, lo que sugiere un importante efecto pleiotrópico y epistático. Observando las interacciones de los tres loci se comprobó que el alelo Sahara confirió una mayor tolerancia en el caso de la existencia de una presión de selección fuerte (el tratamiento de boro 40 mM). En el tratamiento 30 mM la interacción de los tres alelos S siguió aumentando los valores de las variables de longitud, pero disminuyó la capacidad de regeneración. Este efecto pudo deberse a la mayor aptitud para cultivo *in vitro* del parental Clipper, lo que se trasladaría a la progenie que presentase una haplotipo semejante.

Las plantas, bajo condiciones tóxicas de boro, siguen un patrón de crecimiento del tallo más alargado de lo normal y además presentan menos ahijamiento (Roessner et al., 2006). En nuestro experimento se detectó este efecto en Clipper, que presentó una hoja estrecha, lo que condujo a una reducción del área foliar.

No se han encontrado referencias sobre la asociación de la longitud de tallo y QTL's de tolerancia a boro, cosa que se ha determinado en este trabajo. Jefferies et al. (1999) encontraron un QTL asociado con el peso seco de la parte aérea en el cromosoma 4H, en el que el alelo de Sahara producía un peso seco alto.

En este trabajo se demostró que el marcador EBmac679 (4H), localizado a 5 cM del marcador del pico del QTL de Jefferies en la población Clipper x Sahara, estaba fuertemente asociado con la longitud del tallo *in vitro*. Recientemente se ha descrito el gen *BORI* como codificantes de una proteína de membrana relacionada con un mecanismo de exclusión en las raíces y la gutación en las hojas, siendo ambos sistemas, posiblemente, los principales generadores de tolerancia (Sutton et al., 2007). Este gen está localizado en el cromosoma 4H de cebada, y cosegrega con el locus *Bot1* de tolerancia a boro determinado por Jefferies.

Además del locus EBmac679, el locus Bmac67 (3H) resultó estar asociado significativamente a la longitud del tallo, donde el alelo S también confirió un aumento

de la longitud con valores similares a los de EBmac679. El loci Bmac93 no resultó estar significativamente implicado en la respuesta a toxicidad de boro en la raíz y tallo.

Algunos autores han descrito la existencia de una fuerte correlación entre la acumulación de boro en tallos y raíces con la mayor o menor tolerancia a boro que presentan los distintos genotipos (Paull et al., 1992; Hu and Brown, 1997; Nable et al., 1997; Hayes and Reid, 2004). En estos mismos trabajos, se determinó que, en términos de peso seco, el crecimiento radicular es más sensible que el crecimiento de la parte aérea. Los loci Bmac67 y EBmac679 fueron descritos por Jefferies et al. (1999) como los determinantes de un 39 % de la variación en la longitud de la raíz bajo condiciones tóxicas de boro, donde el alelo de Sahara confería un incremento en la longitud de la raíz, siendo el alelo S de EBmac679 el que más contribuía. En este trabajo, se encontraron resultados equivalentes: estos dos loci estaban implicados de manera significativa en la tolerancia en condiciones de toxicidad de boro, aunque en nuestro caso es el alelo S del locus Bmac67 el que produjo mayores efectos, aumentando la longitud radicular en 0,31 cm frente a los 0,23 o 0,07 de EBmac679, en los tratamientos B30 y B40, respectivamente.

Lo que parece ser común para todas las plantas es que un incremento de las concentraciones de boro en el subsuelo produce la reducción del crecimiento de la raíz (Choi et al., 2006). Sin embargo, a concentraciones intermedias de boro y con genotipos tolerantes, es posible obtener un incremento del crecimiento de la raíz en la zona superior del perfil del suelo, sin acusar pérdidas en la eficiencia en el uso de agua, hecho que fue descrito para Sahara (Reid, 2010). La disminución del crecimiento se considera que puede ser debida a una gran reducción de azúcares fosforilados en las puntas meristemáticas de las raíces de los genotipos sensibles (Choi et al., 2007). Los resultados de estos autores coinciden con los de este trabajo, donde las longitudes de las raíces del Sahara no disminuyeron en las concentraciones bajas de boro pero, a concentraciones altas, sí lo hicieron de igual modo a como sucede en los cultivares sensibles a la toxicidad del boro.

Un estudio sobre la regeneración de embriones bajo la toxicidad por boro desarrollado por Eglinton et al. (2004) detectó “que en presencia de boro existe un mayor porcentaje de regeneración de las líneas que llevan el alelo de Sahara en los loci del 3H y 4H sobre aquellos que no los llevan”. En este trabajo hicimos dos distinciones: el efecto de las interacciones bajo el tratamiento intermedio (30 mM) y el tratamiento fuerte (40 mM). En ambos casos el efecto del alelo S en la interacción tratamiento.Bmac67 (3H) no fue significativo. Sí lo fue el efecto de la interacción de este locus con el tratamiento y cada uno de los otros dos loci, resultando en un aumento o disminución del número de regenerantes, en el tratamiento de 30 mM o 40 mM, respectivamente. En nuestro trabajo, a diferencia del de Eglinton, también se encontró un efecto significativo del locus Bmac93 sobre el número de regenerantes, provocando el alelo S una disminución de éstos.

Por otro lado se observó un gran efecto positivo en el alelo Sahara de EBmac679 (4H), lo que concuerda con los resultados de Eglinton et al (2004). El efecto de la interacción del tratamiento 40 mM con los tres loci en conjunto fue incrementar el número de regenerantes, por lo que se observó epistasia dominante: el efecto del alelo Sahara en EBmac679 compensó sobradamente el efecto de los otros dos loci. El efecto de la interacción del tratamiento 30mM con los tres loci en conjunto fue disminuir el número de regenerantes, que como se comentó más arriba pudo ser debido a la mejor aptitud de cultivo *in vitro* del genotipo Clipper.

Para el número de regenerantes reales, carácter únicamente medido en este trabajo, el efecto del alelo S resultó significativo en las interacciones entre el

tratamiento con EBmac679 (4H) y el tratamiento con los tres loci, resultando en un efecto positivo (aumentó el número de regenerantes reales) bajo ambas condiciones de estrés. No resultó significativo el efecto de los loci Bmac67 ni Bmac93.

Eglinton et al. (2004) presentaron un trabajo de caracterización fenotípica de cultivares Sloop y VB9104 a los que se les había introgresado los alelos de tolerancia a boro del cultivar Sahara mediante retrocruzamiento. Además, realizaron un estudio de selección *in vitro* a nivel de microspora, aplicando una cantidad letal de boro en el medio que afectaba a los genotipos sensibles, sólo permitiendo la regeneración de resistentes. No obtuvieron líneas resistentes con los alelos 2H o 6H de Sahara, pero sí con los alelos del 3H y del 4H. La reducción de la producción, y la influencia en otras características agronómicas que no tienen que ver con la tolerancia en las líneas introgresados con los alelos de Sahara demuestra la necesidad de realizar cribados de material a gran escala para poder identificar combinaciones específicas que mejoren los resultados.

En el estudio de Eglinton no se llegó a recuperar del medio de selección ningún regenerante de la variedad Clipper ni de las líneas DH que portaban el alelo Sahara en el loci del 2H y/o 6H, probablemente por la concentración de boro utilizada para realizar el experimento. En nuestro estudio, se recogieron regenerantes de Clipper y de las líneas DH que llevaban el alelo Sahara en el 2H, cuyo efecto es una pequeña disminución en el número de regenerantes. Este resultado no es una discrepancia respecto al estudio citado, la diferencia puede ser debida al uso de una concentración de boro sub-lethal en nuestro medio de cultivo.

Mediante el método de selección *in vitro* que proponemos en este proyecto aumentamos la posibilidad de encontrar líneas resistentes seleccionando una combinación óptima de genes que produzcan el fenotipo de interés. Además aplicamos una presión de selección media por lo que también se han podido caracterizar líneas sensibles y de sensibilidad/tolerancia intermedia.

5.4. CARACTERIZACIÓN DE LA RESISTENCIA/SUSCEPTIBILIDAD AL EXCESO DE BORO DE LA POBLACIÓN DH SAHARA x CLIPPER

El diagnóstico de síntomas visuales para determinar la tolerancia/ susceptibilidad de las líneas DH es un método barato, fácil y ampliamente reproducible. Hay una alta correlación entre los síntomas foliares, el peso seco y la producción. Esto no se puede lograr con otros ensayos para la tolerancia de la toxicidad de boro como son los análisis del contenido de boro en tallo y en hojas (Yau et al., 1995; Torun et al., 2003). Estos métodos podrían no ser fiables (Nable et al., 1990) puesto que la distribución del boro y su acumulación en la planta dependen del ratio de evapotranspiración, eficiencia del uso de agua de los genotipos, la distribución del boro en la planta (por lo que uno debe ser muy minucioso al hacer el muestreo) y porque la lluvia o el riego pueden lixiviar el boro (Riley and Robson, 1994). Otro método es la medición de la longitud radicular, pero se encontraron diferencias significativas (datos no mostrados) en este estudio. Se ha expuesto que las variaciones en la longitud radicular dan cuenta de diferentes modelos de crecimiento más que de diferencias debidas al mecanismo de tolerancia en sí mismo (Reid, 2010).

La cantidad de boro aplicada en el tratamiento para realizar una selección de genotipos es de vital importancia en referencia a la medición de peso seco, contenido de boro y síntomas foliares, ya que permitirá distinguir no sólo las líneas tolerantes y las líneas sensibles sino también los diferentes grados en cada grupo (Paull et al., 1991). Por tanto, podemos considerar que la concentración de 1,6 mM H_3BO_3 utilizada como

tratamiento en nuestro estudio fue una buena elección ya que cubre un amplio rango de tolerancia /susceptibilidad, y porque está entre el rango de concentraciones más utilizadas: Nable et al. (1990) determinaron que la solución de 1 mM H_3BO_3 mantenía una producción máxima de materia seca, Nable (1988) usó 15 μM (control) y 5000 μM en la solución de cultivo, Reid et al. (2004) utilizaron desde 1 mM a 10 mM, Schnurbusch et al. (2008) usaron entre 50 μM y 10 mM H_3BO_3 en trigo.

En este estudio, la interacción altamente significativa entre líneas DH y tratamientos de boro indicaron que la variación genética para tolerancia de boro puede ser probada mediante el ensayo descrito y llevado a cabo en invernadero. Jefferies et al (1999) determinaron que los loci en los cromosomas 2H y 4H representaron el 38 % de la variación de los síntomas foliares, siendo el del 4H el más fuertemente asociado con el rasgo. En este estudio, además de encontrarnos con la misma asociación significativa que Jefferies et al. entre los síntomas foliares con el locus EBmac679 de cromosoma 4H y el locus Bmac93 del 2H, el locus Bmac67 del cromosoma 3H también fue importante. También resultaron significativas las interacciones entre Bmac67 y Bmac679, y la interacción entre los tres loci. Los efectos de los alelos S fueron una disminución en el porcentaje de daño de hoja, es decir, que el alelo de Sahara en cualquiera de los loci confirió una mejor protección contra los efectos tóxicos del boro. El resultado de interacción epistática entre los tres loci en conjunto es una reducción del daño foliar.

Los síntomas aparecieron a los 12 días del tratamiento al igual que aparece recogido en otros trabajos en los que usaron condiciones saturantes de boro para determinar los síntomas (Mahalakshmi et al., 1995).

La expresión de los síntomas de toxicidad de boro en hojas de cebada comienza con el desarrollo de quemaduras de la punta. Progresivamente aparecen manchas marrones y zonas de margen amarillento desde la punta hasta la base del limbo, comenzando en las hojas viejas, además algunos tejidos pueden ser necrotizados (Eaton, 1940; Bennett, 1993; Nable et al., 1997). En este trabajo, los síntomas de toxicidad aparecieron de la manera descrita y además se correlacionó la resistencia a estos síntomas con alelo Sahara en Bmac93. Hassan et al (2010) estudiaron la expresión de proteínas en genotipos tolerantes y susceptibles y propusieron que el efecto de Bmac93 puede ser originado por una actividad estimuladora de la SAMDC (S-adenosilmetionina descarboxilasa, enzima implicada en la biosíntesis de poliaminas), suprimiendo la biosíntesis de etileno y promoviendo la síntesis de poliaminas y, por tanto, retrasando el desarrollo de los síntomas en Sahara.

El efecto de EBmac769 se ha asociado con el gen *Bot1* (Sutton et al., 2007) que codifica un transportador de boro en las raíces. Nuestros resultados indicaron que el alelo de Sahara en EBmac679 provocó una disminución significativa de los síntomas de toxicidad de las dos primeras etapas con, ningún efecto en la tercera etapa y un aumento de la necrosis. Es posible que se alcanzase la saturación de boro en las dos primeras etapas y, por consiguiente, el daño de las membranas celulares a través de peroxidación afectase a la actividad de transporte (Hasegawa et al., 2000), de ahí que el alelo S en EBmac679 solo tenga efecto en las dos primeras etapas. A partir de ese momento, el mecanismo de tolerancia principal es la protección y la desintoxicación de especies reactivas del oxígeno (ROS) por la inducción de la vía de ascorbato-glutatión y síntesis de poliaminas (Hassan et al., 2010), en la que está implicado el loci Bmac93 como se ha indicado antes.

Observando la separación de medias para el carácter porcentaje de daño foliar se observó que solo una línea, DH471, presentó una segregación transgresiva significativa hacia los valores de Clipper, con un 41 % de área foliar dañada. Esta línea también presentó los tres alelos Clipper. Ya que estuvo en el mismo ambiente, presentó la misma

carga génica pero mostró un comportamiento significativamente diferente de Clipper, esto hace suponer que debe existir alguna interacción con otro QTL que esté provocando la disminución significativa de los valores.

5.5. COMENTARIOS FINALES DE LA POBLACIÓN DH SAHARA x CLIPPER

Los resultados obtenidos en este proyecto prueban el éxito del uso de este método de selección *in vitro* para su integración en programas de mejora de tolerancia a boro en cebada. Las principales diferencias con experimentos previos son:

- Para la selección *in vitro*: el efecto no significativo de Bmac67 para el número de regenerantes y la implicación del alelo Sahara de Bmac93 en este carácter (Eglinton et al. (2004) no encontraron ninguna relación).

- Para el daño foliar: La interacción significativa de locus Bmac67 y existencia de interacciones significativas entre los tres loci y todos los caracteres. Jefferies et al. (1999) no obtienen ninguna interacción significativa.

Aunque algunos programas hayan tenido éxito en la introgresión de los QTL's del 2H y del 4H (la selección basada en la exclusión de boro y en síntomas foliares) en nuevos background, no se han obtenido mejoras en el rendimiento (McDonald et al. 2009, Reid 2010). La interacción entre los tres loci indica efectos epistáticos, y por tanto, las posibles combinaciones entre ellos deben estar bajo una especial atención en los programas de mejora. Esta interacción también explica por qué no se obtuvieron mejoras en el rendimiento en la selección basada en la exclusión de boro y los síntomas foliares.

De acuerdo con todos los resultados se podría resumir la acción de los loci de la siguiente manera:

- EBmac679 presentó asociación con todos los parámetros de selección *in vitro* y con el daño foliar.

- Bmac93 asociado exclusivamente con los daños foliares.

- Bmac67 relacionado con las variables de longitud del sistema de selección *in vitro* y con el daño foliar.

Un ejemplo de línea que presenta un buen resultado de resistencia a boro en selección *in vitro* y en el ensayo de riego es DH 492. Presenta un 2,48% de su área foliar afectada bajo las condiciones de riego con exceso de boro y unas medias para los caracteres de selección *in vitro* (longitud radicular y de tallo, y número de regenerantes) similares a las de Sahara.

Se deberían llevar a cabo estudios posteriores para determinar si el proceso de selección *in vitro* bajo concentraciones tóxicas de sustancias es solo dependiente del nivel de resistencia de los genotipos o si está también afectado por la aptitud de dichos genotipos para el crecimiento en las condiciones *in vitro*. Un posible estudio a realizar sería comprobar en esta población las variables de aptitud para el cultivo *in vitro* con la idea de obtener QTL's y compararlos con los resultados obtenidos en esta tesis.

5.6. SELECCIÓN *IN VITRO* DE LA POBLACIÓN CHEVRON x PI383933

A pesar de que existe una extensa bibliografía sobre trabajos de selección *in vitro* se han inscrito en el registro de variedades muy pocas variedades obtenidas con este método en comparación con los métodos de mejora tradicional (Remotti, 1998). En muchos casos existen problemas de regeneración, en otros las resistencias observadas *in vitro* no son estables o no se mantienen en generaciones sucesivas, es decir, más que nuevas combinaciones génicas se han producido cambios epigenéticos. En otras ocasiones la resistencia está acompañada de características agronómicas no deseables.

Sin embargo la selección *in vitro* es una herramienta eficaz en la búsqueda de resistencia mediante el uso de líneas DH procedentes de una F1, sobre todo en casos como el de la FHB, donde la selección de genotipos resistentes es complicada por la poca efectividad de los métodos de selección, la gran influencia ambiental de la enfermedad, y la herencia cuantitativa de la resistencia (De La Pena et al., 1999).

Determinar la resistencia a DON *in vitro* (resistencia de tipo V a *Fusarium*) tiene gran importancia ya que es un buen método para la discriminación temprana de genotipos sensibles y resistentes a gran escala, y en principio es posible debido a que existe correlación entre los niveles de toxina encontrados en las espigas y la disminución del rendimiento en grano (Prom et al., 1997; Adamski et al., 1999; Surma et al., 2000).

Respecto al tipo de explanto que se utiliza en los métodos de selección *in vitro* nos encontramos con callos, somaclones, microsporas, y otros tejidos. Para la selección a resistencia a DON en trigo se utilizaron callos y se consiguieron regenerantes más resistentes que los parentales (Yang et al., 1998). En callos de alfalfa también se obtuvieron buenos resultados (Hartman et al., 1984). Sin embargo, los problemas de regeneración del material vegetal suelen ser un grave problema en los métodos de selección *in vitro*, como en el caso de los callos, con los que nos encontramos trabajos en los que solo se llegan a recuperar un 0,7% de plantas regenerantes (Bruins et al., 1993). Además hay que sumarle luego el problema del albinismo (Bruins et al., 1993) o el de la posible inestabilidad de la resistencia. Binarova et al. (1990) también obtuvieron buenos resultados de resistencia a *Fusarium* con selección *in vitro* de suspensiones celulares de alfalfa. Sin embargo no se llegaron a realizar análisis genéticos de la descendencia para comprobar la heredabilidad de la resistencia.

El ensayo de resistencia *in vitro* sobre hojas escindidas es otro de los sistemas utilizados. Se suelen usar inoculaciones de macroconidia, no filtrados o toxinas. Trabajos con el patosistema trigo- *M. nivale* han encontrado correlaciones entre las categorías de daño (Deadman and Cooke, 1988) observadas con esta técnica de hoja escindida y con los datos de inoculación en invernadero (Diamond and Cooke, 1999). Otros trabajos que han dado correlaciones significativas son los trabajos con *Stagonospora nodorum* (Benedikz et al., 1981), *Septoria tritici* (Arraiano et al., 1998) and *Drechslera teres*. Sin embargo también se encuentran autores que señalan lo contrario que no existe correlación (Arraiano et al., 1998).

Considerando todas estas cuestiones, en este trabajo se utilizaron embriones cigóticos debido a su facilidad de extracción y para evitar los problemas de regeneración.

Entre los métodos de selección *in vitro* para estrés biótico nos encontramos con dos vertientes: la que usa filtrados de cultivos de los patógenos y otra más específica que utiliza toxinas específicas (o una mezcla de éstas).

En la búsqueda de resistencia para *Fusarium* mediante selección *in vitro*, la toxina más utilizada es el ácido fusárico. La selección con ácido fusárico se ha demostrado útil

en la mejora de resistencia de banana, gladiolos, alfalfa, cebada, trigo, patata, piña y tomate (Svabova and Lebeda, 2005). Sin embargo se trata de una toxina no-huésped-específica ya que no se sabe su papel en el desarrollo de la enfermedad, lo que podría dar lugar a artefactos en la selección.

El caso del DON es distinto al del ácido fusárico, puesto que se considera que tiene un papel principal en la patogénesis, se sabe que es un potente inhibidor de la síntesis proteica, que induce la inactivación de genes de defensa y la pérdida de los pigmentos de los cloroplastos (Rotter et al., 1996). También se ha correlacionado con la destrucción de los gránulos de almidón, la disminución de la acumulación de proteínas en el endospermo y la degradación de la pared vegetal con la invasión de *Fusarium* (Snijders, 2004). Muthomi et al (2000) y Eudes et al. (2001) hicieron observaciones parecidas indicando el papel del DON en la agresividad de *F. culmorum* y *F. graminearum* en Triticeae. Por tanto la selección *in vitro* con esta toxina también debería ser eficaz, además de más específica.

El papel del DON como agente patogénico de *F. culmorum* y *F. graminearum* se puso de manifiesto con los ensayos de Proctor et al. (1995) en los que silenciaron el gen *Tri5* que codifica una tricodeína sintasa esencial para la síntesis del esqueleto de los tricotecnos. La pérdida de funcionalidad del gen dio lugar a una disminución en la agresividad indicando que el DON era esencial para el desarrollo de la enfermedad (Bai et al., 2002; Desjardins, 2006). De todos modos, la agresividad no era únicamente dependiente del DON ya que no se perdía por completo la agresividad del patógeno, en las que también podrían estar implicadas enzimas de degradación de la pared vegetal (Mesterhazy, 2002).

Otros grupos de toxinas están teniendo gran interés en los últimos años. Este es el caso del escirpentriol, que se ha encontrado en cereales y productos derivados de consumo animal y humano, aunque en concentraciones más bajas que las encontradas para tricotecnos como el DON (Schollenberger et al., 2007)

Todo esto ha llevado a la conclusión generalizada de que seleccionar material vegetal para resistencia a las toxinas, bien en un medio con la toxina purificada o bien en un medio con filtrado de cultivo, puede dar lugar a la selección de plantas resistentes.

Considerando esta teoría, Eudes et al. (2008) realizaron una selección *in vitro* aplicando un filtrado de cultivo de *Fusarium* o una mezcla de tricotecnos (DON, 15-AcDON, y T-2) en medio de inducción en microsporas de la F1 del cruce de las variedades de trigo Frontana y Norseman. Obtuvieron mayor resistencia en la progenie que en los parentales además de acumular menos DON y presentar mejores características agronómicas bajo las condiciones de selección. Eudes et al. (2008) remarcaron que la selección con toxinas resulta útil en la recuperación de genotipos resistentes, mientras que la selección con filtrados de cultivos de *Fusarium* no. Expusieron que esto puede ser debido a que el co-cultivo de los tricotecnos tiene un mayor efecto en la reducción del contenido de DON posiblemente por un efecto de selección de genes que controlan la detoxificación de la toxina.

En el presente trabajo se caracterizaron finalmente 56 líneas DH de la F1 entre Chevron x PI383933 en dos series para su resistencia *in vitro* a DON, además de los cultivares Chevron y Legacy, y la línea PI383933. Se utilizó el DON como agente selectivo por tratarse de una sustancia con una importante acción en la patogénesis como se mencionó arriba, por el interés de su eliminación en productos de consumo humanos y animal, y por la facilidad de obtención como producto purificado en las casas comerciales.

5.6.1. Búsqueda de la concentración de cribado

Por falta de bibliografía sobre selección *in vitro* para DON en cebada, se comenzó haciendo un cribado en el medio de selección de embriones con concentraciones testadas en embriones, callos y semillas de trigo (Bruins et al., 1993; Yang et al., 1998). Estas concentraciones resultaron letales con lo que se realizó el estudio con siete concentraciones menores que fueron detalladas en material y métodos, y que oscilaron entre $3,4 \times 10^{-7}$ M y 5×10^{-5} M (0,1 y 15 mg/L, repectivamente) y control sin toxina. Fueron concentraciones similares a las utilizadas por Wang and Miller (1988) y Eudes et al (2008) que utilizaron una concentración de 0.23 mg/ L DON en el medio de inducción de microsporas.

Wang y Miller (1988) describieron en un trabajo realizado con coleóptilos de trigo y arroz una correlación entre el nivel de deoxinivalenol, el de 3-acetildeoxinivalenol y otras toxinas con la resistencia en campo de distintos cultivares, considerando el DON y el 3-AcDON como las de mayor efecto. Además concretaron que la concentración mínima para detectar síntomas de toxicidad en cultivares resistentes era de 10^{-3} M y que la longitud de coleóptilos se vio reducida en trigo entre concentraciones de 10^{-3} y 10^{-6} M DON (Wang and Miller, 1988), aunque no se especificaron las concentraciones letales.

En plántulas de trigo se hicieron otros estudios de resistencia a DON situando la inhibición del crecimiento en una concentración de cribado entre $1,5 \times 10^{-5}$ M y $2,5 \times 10^{-5}$ M. (Snijders and Perkowski, 1990) y alrededor de 4×10^{-5} M DON para la inhibición de la germinación de semillas de trigo (Wakulinski, 1989).

En este trabajo la concentración letal en embriones inmaduros corresponde la concentración 7 (5×10^{-5} M) para ambos genotipos, comenzándose a ver los primeros síntomas en el crecimiento para la concentración 2 ($1,7 \times 10^{-6}$ M) en PI383933 y en la concentración 4 ($0,85 \times 10^{-5}$ M) para Chevron. Todo esto indica que, teniendo en cuenta los estudios anteriores y para los genotipos testados, la cebada es más sensible *in vitro* al deoxinivalenol que el trigo.

En este trabajo, el aumento de concentración de DON en el medio de regeneración tuvo como consecuencia la disminución del crecimiento en las plántulas de cebada de los genotipos testados, al igual que ocurrió en los estudios citados arriba. Sin embargo, se observó un aumento en el crecimiento de las raíces de Chevron, la variedad resistente, en las concentraciones más bajas. Este comportamiento no aparece descrito anteriormente en sistemas de búsqueda de resistencia a estrés biótico. Probablemente debamos considerarlo como un efecto del crecimiento propio del cultivar.

Legacy presentó capacidad organogénica en todas las concentraciones exceptuando las más altas. Esta organogénesis cesó antes cuanto mayor fue la concentración de toxina, lo que se puede comprobar observando los datos de número de regenerantes reales y el tamaño medio de las plántulas en las diferentes concentraciones. Este comportamiento es extraño porque implica que la toxina empieza a hacer su efecto con un cierto retraso a pesar de ser un cultivar con un nivel alto de susceptibilidad a FHB, 7 sobre 9 (Smith and Schiefelbein, 2006). Podría tratarse de un efecto secundario de los problemas de hiperhidratación que presenta este genotipo en cultivo *in vitro* más que el de presentar un componente de tolerancia (IV) o de detoxificación de DON (V), ya que existen estudios con plantas inoculadas donde la acumulación de DON es muy alta (baja resistencia tipo V) (Grains, 2009; Halley and Arens, 2010).

Legacy presenta problemas de hiperhidratación (también denominada vitrificación, cristalización o succulencia), un problema que aparece en el cultivo *in vitro* del material vegetal en que las plantas parecen estar cristalizadas en mayor o menor medida. Son las hojas las que suelen sufrir la vitrificación de manera más acusada, presentando una fisiología y morfología anormal. Suelen tener una apariencia

engrosada, succulenta y cristalina, manifestando problemas en la síntesis de determinadas enzimas de la ruta del etileno y procesos asociados a ésta, además de mayor producción de callosa y celulosa con un entrecruzamiento incorrecto (Ziv, 1991; López-Encina, 2012). Estos desordenes surgen debido a una fallo en el aporte de las necesidades específicas de las plantas para la proliferación de tallos en el cultivo *in vitro*. Se ha asociado su aparición con cultivos prolongados, el abuso de hormonas en el medio, sobre todo citoquininas, exceso de vitaminas y de nitrógeno en forma amoniacal (López-Encina, 2012). Puede que la composición del medio FHG no sea la adecuada para obtener plántulas del cultivar Legacy.

Las plantas hiperhidratadas son incapaces de sobrevivir al proceso de trasplante a las condiciones *ex vitro*, y por tanto también explica la poca recuperación del genotipo Legacy en el medio de enraizamiento. Se pueden utilizar diversos métodos para recuperar las plantas vitrificadas como son repicarlas en medios con retardantes de crecimiento o el uso de atmósferas ricas en CO₂ con alto régimen lumínico (López-Encina, 2012).

No se debe confundir el proceso de vitrificación, denominado actualmente como hiperhidratación, propio del cultivo *in vitro*, con el método preparatorio para la crioconservación de material vegetal (Debergh et al., 1992). En este caso, se obtienen plantas con el mismo aspecto pero gracias a la adición de una solución crioprotectora que provoca la solidificación metaestable del material en vez de una cristalización directa que rompería las membranas (Razdan, 2003).

Al examinar la capacidad de enraizamiento de las plantas expuestas a toxina se obtuvieron resultados parecidos a los del boro, ya que las concentraciones mayores de DON no permitieron el desarrollo de las plántulas. Chevron (cv. resistente) solo llegó a enraizar hasta la concentración 5 ($1,7 \times 10^{-5}$ M), y PI383933 (sensible) hasta la concentración 6 ($3,4 \times 10^{-5}$ M). Este rango se corresponde aproximadamente con la concentración de 4×10^{-5} M DON determinado para la inhibición de la germinación por Wakulinski (1989). La diferencia entre ambos genotipos puede deberse a una mayor aptitud para el cultivo *in vitro* de la variedad PI383933 que de la variedad Chevron.

5.6.2. Selección *in vitro*

Los datos obtenidos demuestran la posibilidad de la realización de una discriminación *in vitro* para PI383933 y Chevron, ya que se observa una diferencia significativa entre ellos para las variables medidas (número de regenerantes, número de regenerantes reales, longitud total, de tallo y raíz de las plántulas). Puesto que el peso fresco no ofrecía diferencias entre los parentales no se ha tenido en cuenta en este apartado.

El DON provoca la inhibición del crecimiento de radículas en cereales y en tomate a 2×10^{-5} M DON (Shimada and Otani, 1990; Bottalico and Perrone, 2002), además de la inhibición del crecimiento de plántulas, coleóptilos y raíces de trigo (Shimada and Otani, 1990; Bruins et al., 1993; Eudes et al., 2000). Al igual que se ha descrito en estos trabajos con diferentes tipos de explanto y especie, nosotros hemos obtenido los mismos resultados como efecto del DON sobre el crecimiento de tallo y raíz, y sobre en el número de regenerantes de embriones de cebada.

En este trabajo se observó que existe una correlación entre las longitudes y el número de regenerantes reales obtenidos. La correlación entre estas dos variables es debida a que el DON provoca la reducción del crecimiento de los coleóptilos (Wang and Miller, 1988), raíces y cultivos de tejidos en trigo por la disminución en las mitosis en las células radiculares (Bushnell et al., 2004).

Estos resultados deben ser ahora comparados con ensayos de campo para establecer si existe correlación entre la resistencia observada *in vitro* con la resistencia observada en condiciones de planta adulta.

5.7. DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA DE TIPO V A FHB DE LA POBLACIÓN CHEVRON x PI383933

Existen diversas técnicas de fenotipado para resistencia a FHB. La más habitual es la inoculación directa de esporas en campo o invernadero y posteriormente medir la incidencia de la enfermedad a medida que transcurre el tiempo. Se puede realizar una inoculación con pulverizador que permite detectar la resistencia inicial a la infección (componente tipo I de resistencia a FHB) y a la diseminación de la enfermedad (componente tipo II de resistencia). También se puede realizar una inoculación puntual inyectando la suspensión de esporas en flores una a una, lo que nos permite determinar la resistencia de tipo II (Miedaner et al., 2003). Bai et al. (2001) propusieron sistemas de fenotipado con inoculación de macroconidia que están correlacionados con el DON, y que por tanto resultan interesantes para seleccionar de forma indirecta el bajo contenido de DON. Estos métodos son la medición de la proporción de espiguillas infectadas por espiga a los 21 días de inoculación, el del peso de 1000 semillas y el de la clasificación de los granos en cinco categorías de tamaño.

Sin embargo, no se puede tener en cuenta los tipos de fenotipado citados para conocer el comportamiento de los cultivares al componente de resistencia de tipo IV, que evaluamos en este trabajo, ya que la producción de DON y otras micotoxinas es muy variable en el entorno natural. Además, como la producción de DON puede ocurrir durante todo el desarrollo de la enfermedad, éste se acumulará más en inoculación con espray que en inoculación puntual (Bai et al., 2002). Por ello, hay que tener cuidado al comparar los diferentes trabajos en los que se han llevado a cabo inoculaciones artificiales.

Otros estudios en los que se determina la severidad de la enfermedad usan técnicas bioquímicas como el test ELISA (Enzyme Linke Immuno Sorbent Assay) (Hill et al., 2006) o la cromatografía (Mirocha et al., 1998) para cuantificar la cantidad de patógeno presente o de alguna de las toxinas producidas.

También se han llevado a cabo en diferentes especies ensayos en plántulas (Hoxter et al., 1992; Elmholt et al., 2002) y se ha encontrado correlación entre la fusariosis de los plantones y la FHB (Hestbjerg, 2002). Incluso se han llegado a realizar búsquedas de material resistente a FHB en función de la resistencia a la fusariosis del plantón (Mesterhazy, 1987). Sin embargo, algunos trabajos muestran que no se correlaciona las resistencias de los ensayos de plántula y los de espiga, y se explica que las diferencias se deben a un componente de resistencia solo presente en la planta adulta (Arraiano LS et al., 1998). Por tanto, tampoco parecían buenos métodos para determinar la resistencia de tipo IV que se determinó en la población de este estudio.

En este trabajo se determinó la resistencia/susceptibilidad de las líneas DH de Chevron x PI383933 siguiendo el protocolo establecido para trigo en el trabajo de Lemmens et al. (2005) con alguna modificación que ha sido detallada en el apartado de material y métodos. En dicho trabajo fenotiparon los individuos mediante la aplicación directa de DON en las flores permitiendo la difusión de la toxina en los tejidos gracias a la adición de un detergente en la mezcla del tratamiento. Se escogió el momento de la floración ya que es la principal diana de las especies de *Fusarium* causantes de FHB (Sutton, 1982). Posteriormente determinaron el blanqueamiento que se produce en la

espiga, uno de los daños asociados a la susceptibilidad a DON. Determinaron que existía una gran correlación entre la resistencia a DON evaluada con este método y la resistencia tipo II (resistencia a la dispersión), llegándose a explicar un 50% de la variabilidad observada. El resto de la variabilidad que no explica este modelo se debe a mecanismos de resistencia adicionales (Lemmens et al., 2005).

Se consideró que éste constituía el mejor método de evaluación para el sistema de selección *in vitro* que podíamos acometer, ya que pretendíamos comprobar únicamente el componente de resistencia a DON, no la resistencia completa contra FHB.

En nuestro trabajo se inocularon flores en pre anthesis entre la palea y la lemma con 20 μ L de solución control o tratamiento. La inoculación en estadio de pre anthesis se realiza para asegurar que la fecundación no se hubiese efectuado y poder determinar el efecto que produce el DON sobre la fertilidad y cuajado de la semilla. También se evaluó el blanqueamiento de la espiga. Los ensayos de sensibilidad a DON utilizando como medida el blanqueamiento deben ser realizados con luz ya que la luz activa el proceso (Bushnell et al., 2010).

Como se mostró en resultados, no se encontró blanqueamiento de parte o de toda la espiga a partir del punto de inoculación, como sucede en el trigo, pero sí de las flores tratadas. Este resultado puede ser consecuencia a que existen diferencias anatómicas en el parénquima de las brácteas florales entre de trigo y cebada, así como el tamaño de la células y anchura de las paredes celulares que se vio correlacionada con las diferencias en el grado de resistencia (Pritsch et al., 2000).

Se establecieron seis categorías para el color de los daños producidos por el tratamiento: la 1 en la que no se observaron cambios respecto al control, es decir se mantuvo el color verde de manera íntegra. Las categorías 2 a 5 es en donde se observó un aumento del blanqueamiento (0-25 %, 25-50 %, 50-75 %, 75-100 %). Y se reservó la categoría 6 para las flores afectadas en las que además del blanqueamiento se observó coloración marrón.

El blanqueamiento fue uno de los síntomas más evidentes. Este resultado coincide con otros estudios donde el DON provoca la pérdida dependiente de luz de los pigmentos cloroplastidiales en hojas cortadas de cebada (Seeland and Bushnell, 2001; Bushnell et al., 2002; Bushnell et al., 2010). El DON afecta a los cloroplastos, precedido por daños en plasmalemas y tonoplastos, la pérdida de pigmentos clorofilicos a y b y de los carotenoides, de ahí que se produzca el blanqueamiento. Existen compuestos que pueden tener un efecto protector frente a esta pérdida de pigmentos entre los que encontramos los flavonoides y los ácidos fenólicos de los que la aleurona es el principal productor (Seeland and Bushnell, 2001). Por ello sería interesante realizar un estudio sobre su concentración y producción en los genotipos resistentes frente a los sensibles.

Además del blanqueamiento, en este trabajo se encontraron líneas DH que se clasificaron en la categoría 6 de coloración (presencia de una mancha marrón), en la que también se incluyó PI383933, genotipo sensible a *Fusarium*. Este efecto coincide con el observado en otros trabajos realizados tanto *in vivo* como en callos (Haberlach et al., 1978) en los que se produjo una reacción de hipersensibilidad a la toxina y que se determinó como la tinción marrón del tejido afectado debido a la oxidación de los compuestos fenólicos. La aparición de estas manchas oscuras podría deberse a que los genotipos sensibles no fuesen capaces de detoxificar el DON de manera suficiente, por ejemplo por conjugación con los glucosilados (la mayor acumulación de glucosa y fructosa en glumas de trigo y cebada que se da justo después de anthesis (Ikeda et al., 1955)); y que los compuestos antioxidantes, los fenoles que tiene, tampoco sean

suficientes para tan alta carga de tóxicos y por tanto se oxidan de manera más pronunciada dando esa coloración marrón.

La conjugación del DON corre a cargo de la enzima deoxinivalenol-glucosiltransferasa (DOGT1) que detoxifica el DON y algunos de sus derivados acetilados, aunque no muestra protección frente al nivalenol. La expresión de esta enzima está regulada por la exposición a DON así como a ácido salicílico, etileno y ácido jasmónico. La sobre expresión constitutiva en *Arabidopsis* provocó un aumento de la tolerancia a DON (Poppenberger et al., 2003). En trigo se encontró una estrecha relación entre la concentración del derivado glucosilado DON-3-O-glucósido y la de DON en espiga, llegándose a considerar la conjugación de DON con glucosa el principal mecanismo bioquímico de resistencia a DON (Lemmens et al., 2005). De todas maneras no se sabe si estos derivados glucosilados o acetilados pueden volverse biológicamente activos (tóxicos) en el tracto digestivo de los animales consumidores, por lo que hay que tomarse este descubrimiento con precaución.

En este trabajo se encontraron líneas DH con menos porcentaje de esterilidad y menos blanqueamiento que Chevron, que aunque no sea un parental de nuestra población tiene una gran resistencia a FHB, por lo que comparando genotipos con los valores obtenidos por Chevron podemos comparar los rangos de resistencia que tenemos en la población. El 65 % de las líneas caen en el grupo de mayor esterilidad ocasionada por el tratamiento, en el que también se encuentra PI383933.

La esterilidad podría ser causada por los daños ocasionados por el DON ya que la presencia de DON también puede ejercer una activación de la apoptosis celular en trigo y cebada (Desmond et al., 2008; Bushnell et al., 2010). Se ha descrito que los tejidos de las espigas de variedades resistentes de trigo infectadas presentaban una acumulación de DON menor que podría ser causa de la activación de los mecanismos de defensa contra el patógeno (Kang and Buchenauer, 2000). Se ha comprobado que al igual que ocurre con otras enfermedades, la inoculación de macroconidia provoca la activación de defensas sistémicas como son la activación de genes de peroxidasas (PR1, PR2 (glucanasas), PR3 (quitinasas), PR4 Y PR5 (thaumatin-like proteins) (Pritsch et al., 2000; Pritsch et al., 2001). Esto forma parte de la activación del sistema SAR (Systemic Acquired Resistance), la respuesta en ausencia de contacto directo con el patógeno. Tanto la activación local como sistémica de las defensas en el estudio de Pritsch se formó entre las 24 y las 48 horas después de la inoculación, coincidiendo en el tiempo con la formación de la red de hifas en las superficies interiores de lemma, glumas y pálea, proceso que precede la entrada de las hifas en los tejidos mencionados y en la parte superior del ovario invadiendo posteriormente la raquilla y raquis de forma intracelular (Kang and Buchenauer, 2000). Habría que examinar si se trata del punto de máxima producción de DON.

5.7.1. Correlación selección *in vitro*- resistencia de tipo V a FHB

En este trabajo se observó que las correlaciones entre las variables de selección *in vitro* y las del fenotipado resultaron ser negativas. Es decir, a mayor regeneración y longitud de las plántulas supervivientes *in vitro* menor porcentaje de esterilidad y daños presentan en el ensayo de inoculación de DON. Los valores de las correlaciones varían entre un -0,548 para Numero de regenerantes reales y categoría de color, y un -0,708 para longitud total y esterilidad.

De la Pena et al. (1999) y Urrea et al. (2002) encontraron que la acumulación de DON está correlacionada positivamente con la severidad de FHB. Mesterhazy et al. (2005) mostraron datos de contenido de DON, porcentaje de granos dañados (medidos

como decoloración y “stomstones kernels”), porcentaje de severidad y pérdida de rendimiento en inoculaciones con diferentes especies de *Fusarium*. Encontraron un gran correlación entre el contenido de DON y la decoloración de la espiga ($r = 0,9$, $p < 0.01$), y al igual que entre el contenido de DON y la severidad. Sin embargo, la pérdida de rendimiento no estaba tan relacionada con el DON como los otros parámetros.

Como se explicó en la introducción, las pérdidas de rendimiento por la enfermedad son devastadoras (disminución del tamaño del grano). Pero también lo son de cara al consumo las que provoca la aparición de toxinas en el grano, que hace que se deseche si sobrepasan ciertos límites legales. Algunas especies como *F. poae*, *F. sporotrichioides*, *F. acuminatum* y *F. sambucinum* son consideradas de manera general como no productoras de DON. En realidad son capaces, aunque se desprecia su aportación (Mesterhazy, 2002). Por tanto, el componente de resistencia a DON parece una adecuada diana para la mejora de resistencia general a FHB.

En principio parece plausible la utilización de nuestro método de selección en el medio de regeneración para obtener genotipos resistentes a DON *in vitro*. En general las correlaciones fueron más elevadas para los parámetros de longitud, por lo que en estudios posteriores se aconsejaría la medición de esta variable más que las de regeneración.

La posibilidad de seleccionar en generaciones tempranas reduce el tiempo de los programas de mejora. En el caso de la mejora para FHB se ha discutido la posibilidad de realizar una mayor selección temprana con “puntos o marcas de resistencia” más que la utilización de métodos tradicionales de inoculación y determinación cuantitativa de la concentración de DON en grano a posteriori, que resultan caros (Wilde and Miedaner, 2006). Uno de estos puntos de referencia temprano podría constituirlo la resistencia *in vitro* a DON, y a otras toxinas, o el sistema de fenotipado por inoculación directa de toxina. Se ha visto que existen correlaciones significativas entre los niveles de DON y de resistencia a FHB indicando la posibilidad de seleccionar usando métodos de categorización visual de los síntomas como sistema indirecto de selección para bajos niveles de DON (resistencia)(Bai et al., 2001).

Respecto a los predictores de resistencia parcial en campo, el período de latencia de la enfermedad suele ser un buen indicador de esta (Diamond and Cooke, 1999). En los programas de mejora para *Fusarium* la severidad de la enfermedad en la espiga es el criterio más fácilmente mensurable en los ensayos de campo, y por tanto las correlaciones encontradas entre los ensayos de hoja escindida y la severidad en espiga son de gran importancia (Diamond and Cooke, 1999). En nuestro caso deberíamos conocer la correlación entre la resistencia DON *in vitro* con la severidad de la enfermedad en campo. Por tanto, el siguiente trabajo será comprobar la resistencia real en campo en la que participarán los genotipos con mayor resistencia *in vitro* a DON.

Se han considerado vías alternativas de búsqueda de resistencia, como es la identificación de alelos de componentes de ruta del etileno. En plantas dicotiledóneas, la señalización del etileno es una vía conocida de respuesta a infección con diversos patógenos, como es el caso de *F. graminearum* que aprovecha la vía de señalización de esta hormona en su propio beneficio. El proceso se ha revisado en monocotiledóneas, en concreto en trigo y cebada. En estudios con mutantes de estas especies que presentan una producción o percepción reducida de etileno, se ha comprobado que estos son más resistentes a *F. graminearum* que el genotipo salvaje. Los mutantes con una sobreproducción de etileno resultaron más susceptibles (Chen et al., 2009). De todas maneras existen estudios que nos indican lo contrario, que el etileno ayuda en la resistencia a *F. graminearum* en trigo (Gillespie and Scofield, 2011). Por tanto, solo cabe esperar a la realización de nuevos estudios en este campo que finalmente

determinen si el uso de marcadores basados en la ruta del etileno pueden ser útiles en la determinación de resistencia al DON.

5.8. GENOTIPADO, MAPEADO Y BÚSQUEDA DE QTL'S DE LA POBLACIÓN CHEVRONx PI383933

Se utilizaron marcadores SSR para realizar el genotipado de la población ya que son fáciles de usar, se integran con facilidad en los programas de mejora asistida por marcadores, y están ampliamente descritos en la identificación de resistencias a estreses bióticos en cereales (Mesfin et al., 2003).

Se tuvieron en cuenta los QTL más relevante encontrados para resistencia a FHB o cualquiera de sus componentes (tabla en material y métodos) de los que se comprobó su polimorfismo entre Chevron y PI383933. La mitad de ellos no presentaban polimorfismo, por lo que no se usaron en el genotipado de la población. Debido a que Chevron resultó no ser un parental, no todos estos marcadores resultaron ser realmente polimórficos, pudiendo solo llegar a utilizar seis para la realización del mapa:

Finalmente ninguno de los SSR encajó en cualquiera de los 12 grupos de ligamientos obtenidos con Joinmap 4[®].

Los DArT's son marcadores bialélicos dominantes, y junto a los SNP's tienen una gran relevancia en el campo de la mejora de cereales (Hearnden et al., 2007)

Respecto a la identidad del parental desconocido, después de realizar todas las pruebas descritas en resultados, no se pudo llegar a un emparejamiento positivo. La conclusión más plausible es que las semillas de partida para la producción de la población F1 provenientes de Minnesota estaban mezcladas y se utilizó de una línea de mejora no determinada, de seis carreras y primavera, como parental.

Sin embargo, podemos comparar los resultados de la población con los Chevron, al ser una variedad de cebada ampliamente descrita es su uso como línea de mejora en programas de búsqueda de resistencia a FHB, y establecer un rango de resistencia.

5.8.1. El 1H

Se ha encontrado relación del QTL de LR(I) que se determinó en este trabajo con los QTL: Ppd-H2 autumn y Ppd-H2 spring de días a espigado, el QGN.BIKy-7H.2 de contenido de nitrógeno en grano, además de QYld.HaMo-1H.1 asociado a (Wenzl et al., 2006). También coinciden con los encontrados por Marquez-Cedillo (Marquez-Cedillo et al., 2000): QMe.HaMo-1H.2 y QMe.nab-1H.2 de porcentaje de extracto de malta y QTW.HaMo-1H de peso de semilla. QFhs.dah-1H.2 asociado con la reacción a *Fusarium graminearum* en la cebada Zhedar2 (Dahleen et al., 2003).

El QTL de Flores (II) también resultó coincidir con el QFhs.dah-1H.2 antes descrito.

El QTL de Cañas (I) no se encuentra relacionado con otros QTL.

5.8.2. El 2H

El QTL de Esterilidad (I) resultó caer en la misma región que los QTL QHd.StMo-2H.2 asociado a días a espigado y QYld.StMo-2H.2 relacionado con el rendimiento (Hayes et al., 1993). Esterilidad (I) resultó asociado al marcador bPb-8143, que cae en el intervalo entre vrs1 (dos o seis carreras) y MWG503, intervalo que delimita los QTL's QFhs.umn-2H.3 y QDon.umn-2H.1 asociados a la reacción frente

FHB y de acumulación de DON, respectivamente (Mesfin et al., 2003). También coincidieron con los QTL's AFhs.dah-2H.2 y QDon.dah-2H.2 implicados en la reacción a *Fusarium graminearum* y en la acumulación de DON (Dahleen et al., 2003). Por tanto, podríamos considerar el sistema de inoculación de DON en flores midiendo la esterilidad producida como un buen sistema de fenotipado para el componente de resistencia de tipo V.

Aunque sí se han validado QTL de decoloración en cromosomas 2H y 6H (De La Pena et al., 1999), en este trabajo no hemos encontrado ninguna asociación con el carácter coloración.

Los QTL's de Altura(I), LEsp(I), Flores(I) y Granos(I) coincidieron en la misma zona que el QTL QGms.StMo-2H de rapidez de germinación (Mano and Takeda, 1997), además del QTL de porcentaje de extracto de malta QMe.DiMo-2H (Szucs et al., 2009).

El QTL Flores (II) resultó coincidente con los QTL: QAa.StMo-2H de actividad de la α -amilasa (Szucs et al., 2009), y QFhs.umn-2H.1 relacionado con la reacción a FHB de cebada en inoculación en invernadero (Mesfin et al., 2003).

NRReal(I)a se encuentra en el intervalo de los QTL's QFhs.umn-2H.2 y QHD.umn-2H.1, relacionados con la reacción a *Fusarium graminearum* y los días a espigado, repetivamente (Mesfin et al., 2003).

NRReal(I)b también se encuentra en un intervalo asociado con los QTL de reacción a *Fusarium graminearum*, días a espigado y acumulación de DON descritos por Mesfin (2003).

El QTL LTa(I) resultó caer en la misma región que el QHt.StMo-2H.2 de altura de planta (Hayes et al., 1993) y el gen *Ipa1* (ideal plant architecture1) involucrado en el encañado (Yongqing et al., 2010).

Este mismo QTL, LTa(1), y el LT (I) están enmarcados entre los marcadores HVM54 y el ABC252, que delimitan varios QTL's relacionados con FHB: QFhs.umn-2H.0 (reacción a *Fusarium graminearum*), QHD.umn-2H.2 (días a espigado), QFhs.umn-2H.7 (reacción a *Fusarium graminearum*), QHD.umn-2H.3 (días a espigado), y QDon.umn-2H.2 (acumulación de DON) (Mesfin et al., 2003). Por tanto, cabría considerar la medición de la longitud de las plántulas en selección *in vitro* para la determinación de resistencia de tipo V como un buen sistema de selección.

Los QTL de Cañas (II), LEsp (II), LTa(I), Granos (II) y NRReal(I).2 no presentaron ninguna relación con cualquier otro QTL conocido.

En todos los estudios revisados, los QTL del cromosoma 2H son los que explican la mayor variación fenotípica. Días a espigado, altura de la planta, ángulo de la espiga, densidad de la espiga, y el tipo de espiga están correlacionados negativamente con la severidad de FHB (De La Pena et al., 1999; Zhu et al., 1999; Ma et al., 2000; Urrea et al., 2002) y están asociados históricamente a la enfermedad por tratarse de sistema de escape. Ma et al. (2009) encuentran correlación significativa entre los síntomas de FHB y los niveles de DON, aunque no encuentran correlación entre los niveles de síntomas y la altura de la planta o el día de espigado.

5.8.3. El 3H

El QTL LEsp(II) cae sobre la misma zona que el QNb.StMo-3H.1 de reacción frente a helmintosporiosis (Steffenson et al., 1996), y con un gen, *mo7a*, que provoca el cambio de los estambres por carpelos en flores de cebada (Soule et al., 2000).

Se ha encontrado que los QTL's LT(II) y LTa(II), que comparten localización, y el altura (I), coinciden con dos QTL determinados por Mesfin et al. (2003), QFhs.umn-3H.2 asociado con la reacción a FHB en cebada y QHD.umn-3H asociado a los días de

espigado, carácter tradicionalmente relacionado con la resistencia a *Fusarium* por un factor de escape.

Los QTL de altura (II) y flores (II) no resultaron coincidentes con QTL's conocidos.

5.8.4. El 4H

No se obtuvieron QTL's en este cromosoma.

5.8.5. El 5H

Granos(I) y LT(I) coincidieron con el QTL de reacción a *Fusarium graminearum* QFhs.dah-5H.1 (Dahleen et al., 2003; Dahleen LS et al., 2003). Además el LT(I) resultó coincidente con Rec(4)_11.0, asociado a la resistencia no hueped específica a roya (Jafary et al., 2008).

5.8.6. El 6H

El QTL de esterilidad (II) y de NR(II) coinciden con otro determinado en avena para la reacción a *Erysiphe graminis* DC (Schneider et al., 1991). También aparece relacionado con el QSss.StMo-6H, asociado a la sensibilidad de las plántulas de cebada a sal (Mano and Takeda, 1997).

Los QTL NRReal(II) y LTa(II), coinciden con los QTL: QGN.BIKy-6H de contenido de Nitrogeno en grano, QKps.BIKy-6H de granos por espiga, QPgw.BIKy-6H y QSgw.BIKy-6H.1 de peso de semillas (Wenzl et al., 2006).

El QTL de LR(I) se ha encontrado coincidente con QTW.HaMo-6H.1, asociado con el peso de semilla (Close et al., 2009)

LR(I) y NRReal(II) coinciden con QTL's determinados por Dahleen et al. (2003), QFsh.dah-6H.1, QDon.dah-6H.1 y QHD.dah-6H de reacción contra *Fusarium graminearum*, acumulación de DON y días a espigado, respectivamente.

El QTL de NR(I), el LT(I), el de flores (I), y los dos de Cañas (II) no aparecen en ninguna otra referencia bibliográfica.

5.8.7. El 7H

Para los QTL's detectados relacionados con LT(I) no se encontraron QTL's relacionados.

Para el QTL's de LTa(I) se encontró un marcador relacionado, el Bmag0353, que se encuentra asociado a los QTL's QHei.pil-4H.3, de altura, y QTwg.pil-4H.3 de peso de grano (Pillen et al., 2003)

El QTL para cañas, de Flores(I), LEsp(I) y altura(I), que caen en la misma zona, guardan relación con el marcador iEst5, que forma parte del gen Est5, que codifica una estearasa (von Wettstein-Knowles, 1993). Flores(I) también está relacionado con QHD.umn-7H.1, días a espigado (Mesfin et al., 2003)

El QTL de altura (II) tiene asociado un marcador que está relacionado con QTL's de resistencia a estrés abiótico: QNba-TiTa-7H, de reacción a helmintosporiosis, QNbs-KeGa-7H y QNbs-TiTa-7H, de reacción a helmintosporiosis de plántula, (Williams et al., 2003).

Un QTL de LEsp(II) adicional coincide con :QMt.pil, asociado a la "ternura" de la malta (Pillen et al., 2003) y con QHD.umn-7H.2, días a espigado (Mesfin et al., 2003)

6. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La producción de doble haploides mediante cultivo de anteras resultó ser más productiva que mediante cultivo de microsporas para los genotipos utilizados.
2. El cultivar Clipper presenta buena aptitud para el cultivo *in vitro* mientras que el resto de los genotipos (Sahara, Chevron, PI383933) son recalcitrantes: Sahara debido a la gran tasa de albinismo y Chevron y PI383933 por su baja respuesta.
3. La concentración letal de boro en el medio de regeneración para la población DH Sahara x Clipper fue de 40 mM. La concentración de 30 mM de boro sirvió para seleccionar individuos tolerantes.
4. Existen interacciones significativas entre los parámetros de selección *in vitro*, el tratamiento con boro y los tres loci conocidos, lo que sugiere un importante efecto pleiotrópico y epistático.
5. La recuperación de líneas doble-haploides que presentaban los alelos de Sahara indica la posibilidad de realizar cribados de embriones cigóticos para la selección *in vitro* de genotipos tolerantes a boro.
6. El método de medición de daños foliares mediante el escaneo de las hojas y posterior análisis con el software “Compu Eye, Leaf & Symptom Area” (Bakr, 2005) es eficaz y sencillo.
7. La interacción altamente significativa entre líneas DH y tratamiento de boro en agua de riego indica que la variación genética para tolerancia de boro puede ser probada mediante el ensayo en invernadero descrito.
8. Los síntomas foliares presentaron asociación significativa con el locus EMac679 de cromosoma 4H, el locus Bmac93 del 2H y el locus Bmac67 del cromosoma 3H. El alelo de Sahara en EMac679 provocó una disminución significativa de los síntomas de toxicidad de las dos primeras etapas con, ningún efecto en la tercera etapa. Bmac93 resultó asociado exclusivamente con los daños foliares.
9. La concentración letal de DON en embriones inmaduros corresponde la concentración 7 ($5 \times 10^{-5} M$) para ambos genotipos. En PI383933 se empiezan a ver los primeros síntomas en el crecimiento en la concentración 2 ($1,7 \times 10^{-6} M$) y en la concentración 4 ($0,85 \times 10^{-5} M$) para Chevron.
10. Las concentraciones citadas indican que, la cebada es más sensible al deoxinivalenol que el trigo, en cultivo *in vitro*.
11. Las correlaciones entre las variables de selección *in vitro* y las del fenotipado, fueron negativas. Es decir, que a mayor regeneración y longitud de las plántulas supervivientes *in vitro* menor porcentaje de esterilidad y daños presentan en el ensayo de inoculación de DON. Los valores de las correlaciones varían entre un -0,548 para Numero de regenerantes reales y categoría de color, y un -0,708 para longitud total y esterilidad.

12. En la inoculación de flores con toxina no se encontró blanqueamiento de parte o de toda la espiga a partir del punto de inoculación, como sucede en el trigo, pero sí de las flores tratadas.
13. Se encontraron un total de 57 QTL's en ambas series, asociados a los caracteres de selección *in vitro*, a los de inoculación de DON en flor en invernadero y los caracteres morfológicos. Algunos QTL resultaron coincidentes entre sí, o con QTL's determinados anteriormente y relacionados con caracteres de resistencia, calidad y arquitectura de la planta.
14. El QTL Esterilidad (I)-2H coincide con los QTL's asociados a la reacción frente FHB y de acumulación de DON, respectivamente. Además el QTL Flores (II)-2H resultó coincidente con QFhs.umn-2H.1 relacionado con la reacción a FHB de cebada en inoculación en invernadero. Por tanto, consideramos el sistema de inoculación de DON en flores midiendo la esterilidad producida como un buen sistema de fenotipado para el componente de resistencia de tipo V a *Fusarium*.
15. Los QTL's LTa(I)-2H, LTa(II)-3H, LT (I)-2H y LT(II)-3H resultaron coincidir con varios QTL's relacionados con la resistencia FHB, asociados a la acumulación a DON, días a espigado y reacción frente a FHB en invernadero. Por tanto, el sistema de inoculación de DON en flores es un sistema de fenotipado para la el componente de resistencia de tipo V a *Fusarium*.

7. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Adamski T, Chekowski J, Golinski P, Kaczmarek Z, Kostecki M, Perkowski J, Surma M, Wisniewska H** (1999) Yield reduction and mycotoxin accumulation in barley doubled haploids inoculated with *Fusarium culmorum* (W.G.Sm.) Sacc. *Journal of Applied Genetics* **40**: 73-84
- Ahmed KZ, Mesterhazy A, Bartok T, Sagi F** (1996) In vitro techniques for selecting wheat (*Triticum aestivum* L) for Fusarium-resistance. 2. Culture filtrate technique and inheritance of Fusarium-resistance in the somaclones. *Euphytica* **91**: 341-349
- Ahmed KZ, Mesterhazy A, Sagi F** (1991) Invitro Techniques for Selecting Wheat (*Triticum-Aestivum* L) for Fusarium-Resistance.1. Double-Layer Culture Technique. *Euphytica* **57**: 251-257
- Anand A, Zhou T, Trick HN, Gill BS, Bockus WW, Muthukrishnan S** (2003) Greenhouse and field testing of transgenic wheat plants stably expressing genes for thaumatin-like protein, chitinase and glucanase against *Fusarium graminearum*. *Journal of Experimental Botany* **54**: 1101
- Anon** (1983) Protection against Trichothecene Mycotoxins. National Academy Press Wahsington DC
- Arraiano LS, Brading PA, JKM. B** (1998) A detached seedling leaf technique to screen for resistance to *Mycosphaerella graminicola* (*Septoria tritici*) in wheat varieties. 7th International Congress of Plant Pathology Abstracts **3**: 3.4.52
- Arraiano LS, Brading PA, Brown JKM** (1998) A detached seedling leaf technique to screen for resistance to *Mycosphaerella graminicola* (*Septoria tritici*) in wheat varieties. 7th International Congress of Plant Pathology Abstracts **3**: 3.4.52
- Arumuganathan K, Earle ED** (1991) Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter* **9**: 208-218
- Atanasoff D** (1920) Fusarium blight (scab) of wheat and other cereals. *Journal of Agricultural Research* **20**: 1-32
- Ayres PG, Owen H** (1971) Resistance of barley varieties to establishment of subcuticular mycelia by *Rhynchosporium secalis*. *Transactions of the British Mycological Society* **57**: 233-240
- Azhaguvel P, Komatsuda T** (2007) A phylogenetic analysis based on nucleotide sequence of a marker linked to the brittle rachis locus indicates a diphyletic origin of barley. *Annals of Botany* **100**: 1009-1015
- Bai GH, Desjardins AE, Plattner RD** (2002) Deoxynivalenol-nonproducing *Fusarium graminearum* Causes Initial Infection, but does not Cause Disease Spread in Wheat Spikes. *Mycopathologia* **153**: 91-98
- Bai GH, Plattner R, Desjardins A, Kolb F, Jones SS** (2001) Resistance to fusarium head blight and deoxynivalenol accumulation in wheat. *Plant Breeding* **120**: 1-6
- Bajaj YPS, Somers DA, Anderson PC** (1994) In Vitro Selection for Herbicide Tolerance in Maize. *In Maize*, Vol 25. Springer Berlin Heidelberg, pp 293-313
- Bakr EM** (2005) A new software for measuring leaf area, and area damaged by *Tetranychus urticae* Koch. *Journal of Applied Entomology* **129**: 173-175
- Bañuelos GS, Cardon GE, Phene CJ, Wu L, Akohoue S, Zambrzuski S** (1993) Soil boron and selenium removal by three plant species. *Plant and Soil* **148**: 253-263
- Barnabás B, Obert B, Kovacs G** (1999) Colchicine, an efficient genome-doubling agent for maize (*Zea mays* L.) microspores cultured in anthero. *Plant cell reports* **18**: 858-862

- Bartlett RJ, Picarelli CJ** (1973) Availability of boron and phosphorus as affected by liming an acid potato soil. *Soil Science* **116**: 77-83
- Bartok T, Szecsi A, Szekeres A, Mesterhazy A, Bartok M** (2006) Detection of new fumonisin mycotoxins and fumonisin-like compounds by reversed-phase high-performance liquid chromatography/electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **20**: 2447-2462
- Beaumont VH, Rocheford TR, JM. W** (1995) Mapping the anther culture response genes in maize (*Zea mays* L.). *Genome* **Oct;38**: 968-975
- Bell RW** (1997) Diagnosis and prediction of boron deficiency for plant production. *Plant and Soil* **193**: 149-168
- Benedikz PW, Mappledoram CJ, Scott PR** (1981) A laboratory technique for screening cereals for resistance to *Septoria nodorum* using detached seedling leaves. *Transactions of the British Mycological Society* **77** 667-669
- Bennett M, Leitch I** (2005) Plant DNA C-values database *In* www.kew.org/cval/workshopreport.html, Ed Oct. 2005
- Bennett WF** (1993) Nutrient Deficiencies and Toxicities in Crop Plants. APS Press, St Paul, MN, USA.
- Binarova P, Nedelnik J, Fellner M, Nedbalkova B** (1990) Selection for Resistance to Filtrates of *Fusarium*-Spp in Embryogenic Cell-Suspension Culture of *Medicago-Sativa* L. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **22**: 191-196
- Binarova P, Nedelnik J, Fellner M, Nedbalikova B** (1990) Selection for resistance to filtrates of *Fusarium* spp. in embryogenic cell suspension culture of *Medicago sativa* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **22**: 191-196
- Binh DQ, Heszky LE, Gyulai G, Csillag A** (1992) Plant-regeneration of NaCl-pretreated cells from long-term suspension-culture of rice (*Oryza sativa* L) in high saline conditions. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **29**: 75-82
- Blakeslee AF, Belling J, Farnham ME, Bergner AD** (1922) A haploid mutant in the Jimson Weed, "datura stramonium". *Science* **55**: 646-647
- Blevins DG, Lukaszewski KM** (1998) Boron in plant structure and function. *In* Annual Review of Plant Biology, Vol 49, pp 481-500
- Bottalico A, Perrone G** (2002) Toxigenic *Fusarium* species and Mycotoxins Associated with Head Blight in Small-Grain Cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology* **108**: 611-624
- Boutigny A-L, Richard-Forget F, Barreau C** (2008) Natural mechanisms for cereal resistance to the accumulation of *Fusarium* trichothecenes. *European Journal of Plant Pathology* **121**: 411-423
- Bregitzer P, Poulson M** (1995) Agronomic performance of barley lines derived from Tissue-Culture. *Crop Science* **35**: 1144-1148
- Brennan RF, Adcock KG** (2004) Incidence of boron toxicity in spring barley in southwestern Australia. *Journal of Plant Nutrition* **27**: 411-425
- Bright SW, Jones MGK** (1985) Cereal Tissue and Cell Culture. Springer
- Brown HT** (1906) On the culture of excised embryos of barley on nutrient solutions containing nitrogen in different forms. *Trans. Guinness Reserach Laboratory* **1**: 288
- Brown PH, Bellaloui N, Wimmer MA, Bassil ES, Ruiz J, Hu H, Pfeffer H, Dannel F, Romheld V** (2002) Boron in plant biology. *Plant Biology* **4**: 205-223
- Brown PH, Hu HN** (1994) Boron Uptake by Sunflower, Squash and Cultured Tobacco Cells. *Physiologia Plantarum* **91**: 435-441
- Brown PH, Shelp BJ** (1997) Boron mobility in plants. *Plant and Soil* **193**: 85-101

- Bruins MBM, Karsai I, Schepers J, Snijders CHA** (1993) Phytotoxicity of Deoxynivalenol to Wheat Tissue with Regard to in-Vitro Selection for Fusarium Head Blight Resistance. *Plant Science* **94**: 195-206
- Bruins MBM, Snijders CHA** (1995) Inheritance of anther culture derived green plantlet regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **43**: 13-19
- Buerstmayr H, Ban T, Anderson JA** (2009) QTL mapping and marker-assisted selection for Fusarium head blight resistance in wheat: a review. *Plant Breeding* **128**: 1-26
- Buerstmayr H, Legzdina L, Steiner B, Lemmens M** (2004) Variation for resistance to Fusarium head blight in spring barley. *Euphytica* **137**: 279-290
- Buerstmayr H, Lemmens M, Hartl L, Doldi L, Steiner B, Stierschneider M, Ruckenbauer P** (2002) Molecular mapping of QTLs for Fusarium head blight resistance in spring wheat. I. Resistance to fungal spread (type II resistance). *Theoretical and Applied Genetics* **104**: 84-91
- Buerstmayr H, Steiner B, Hartl L, Griesser M, Angerer N, Lengauer D, Miedaner T, Schneider B, Lemmens M** (2003) Molecular mapping of QTLs for Fusarium head blight resistance in spring wheat. II. Resistance to fungal penetration and spread. *Theoretical and Applied Genetics* **107**: 503-508
- Bushnell, Hazen BE, Pritsch C** (2004) Histology and Physiology of Fusarium Head Blight. In KJ Leonard, WR Bushnell, eds, *Fusarium Head Blight of Wheat and Barley*. APS PRESS, Berlin
- Bushnell WR, Perkins-Veazie P, Russo VM, Collins J, Seeland TM** (2010) Effects of deoxynivalenol on content of chloroplast pigments in barley leaf tissues. *Phytopathology* **100**: 33-41
- Bushnell WR, Seeland TM, Krueger DE** (2002) Light-dependent bleaching of detached barley leaf tissue by deoxynivalenol. *Phytopathology* **92**: S11
- Camacho-Cristobal JJ, Rexach J, González-Fontes A** (2008) Boron in plants: Deficiency and toxicity. *Journal of Integrative Plant Biology* **50**: 1247-1255
- Canady RA, Coker RD, Egan SK, Krska R, Kuiper-Goodman T, Olsen M, Pestka J, Resnik S, J. S** (2005) Deoxynivalenol. In. <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je05.htm>
- Canci PC, Nduulu LM, Dill-Macky R, Muehlbauer GJ, Rasmusson DC, Smith KP** (2003) Genetic Relationship between Kernel Discoloration and Grain Protein Concentration in Barley. *Crop Science* **43**: 1671-1679
- Caredda S, Devaux P, Sangwan RS, Clement C** (1999) Differential development of plastids during microspore embryogenesis in barley. *Protoplasma* **208**: 248-256
- Caredda S, Doncoeur C, Devaux P, Sangwan RS, Clement C** (2000) Plastid differentiation during androgenesis in albino and non-albino producing cultivars of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Sexual Plant Reproduction* **13**: 95-104
- Cartwright B, Zarcinas BA, Spouncer LR** (1986) Boron toxicity in South Australian barley crops. *Australian Journal of Agricultural Research* **37**: 351-359
- Castillo AM, Egaña B, Sanz JM, Cistue L** (1998) Somatic embryogenesis and plant regeneration from barley cultivars grown in Spain. *Plant Cell Reports* **17**: 902-906
- Castillo AM, Valles MP, Cistue L** (2000) Comparison of anther and isolated microspore cultures in barley. Effects of culture density and regeneration medium. *Euphytica* **113**: 1-8
- Cistué L, Cuesta-Marcos A, Chao S, Echávarri B, Chutimanitsakun Y, Corey A, Filichkina T, Garcia-Mariño N, Romagosa I, Hayes P** (2011) Comparative

- mapping of the Oregon Wolfe Barley using doubled haploid lines derived from female and male gametes. *Theoretical and Applied Genetics (TAG)* **122**: 1399-1410
- Cistué L, Ramos A, Castillo AM** (1998) Influence of anther pretreatment and culture medium composition on the production of barley doubled haploids from model and low responding cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **55**: 159-166
- Cistué L, Ramos A, Castillo AM** (1999) Influence of anther pretreatment and culture medium composition on the production of barley doubled haploid plants from model and low responding cultivars. *Plant Cell Tissue Organ Cult*
- Cistué L, Ramos A, Castillo AM, Romagosa I** (1994) Production of large number of doubled haploid plants from barley anthers pretreated with high concentrations of mannitol. *Plant Cell Reports* **13**: 709-712
- Cistué L, Vallés MP, Echávarri B, Sanz JM, Castillo AM** (2004) Barley anther culture. In KK Maluszynski M, Foster B, ed, *Doubled Haploid Production in Crop Plants: A Manual*. FAO/IAEA División, Viena, Austria, pp 29-35
- Cistué L, Ziauddin A, Simion E, Kasha KJ** (1995) Effects of culture conditions on isolated microspore response of barley cultivar Igri. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **42**: 163-169
- Cistué L., Vallés M.P., Echávarri B., Sanz J.M., A.M. C** (2004) Barley anther culture. In KK Maluszynski M, Foster B, ed, *Doubled Haploid Production in Crop Plants. A Manual*. FAO/IAEA División, Viena, Austria, pp 29-35
- Close T, Bhat P, Lonardi S, Wu Y, Rostoks N, Ramsay L, Druka A, Stein N, Svensson J, Wanamaker S, Bozdog S, Roose M, Moscou M, Chao S, Varshney R, Szacs P, Sato K, Hayes P, Matthews D, Kleinhofs A, Muehlbauer G, DeYoung J, Marshall D, Madishetty K, Fenton R, Condamine P, Graner A, Waugh R** (2009) Development and implementation of high-throughput SNP genotyping in barley. *BMC Genomics* **10**: 1-13
- Comission Regulation EC** (2006) Comission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. In. Official Journal of the European Union, http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/site/en/oj/2006/l_364/l_36420061220en00050024.pdf
- Consortium BGS** (2012) A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. The International Barley Genome Sequencing Consortium. *Nature* **491**: 711-716
- Chaleff RS, Keil RL** (1981) Genetic and physiological variability among cultured cells and regenerated plants of *Nicotiana tabacum*. *Molecular and General Genetics* **181**: 254-258
- Champeil A, Dore T, Fourbet JF** (2004) Fusarium head blight: Epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by Fusarium in wheat grains. *Plant Science* **166**: 1389-1415
- Chandler SF, Thorpe TA** (1986) Variation from plant tissue cultures: Biotechnological application to improving salinity tolerance. *Biotechnology Advances* **4**: 117-135
- Chantachume Y** (1995) Genetic studies on the tolerance of wheat to high concentrations of boron. University of Adelaide, Australia
- Chantachume Y, Smith D, Hollamby GJ, Paull JG, Rathjen AJ** (1995) Screening for boron tolerance in wheat (*T. aestivum*) by solution culture in filter paper. *Plant and Soil* **177**: 249-254

- Chawla HS, Wenzel G** (1987) In vitro Selection for Fusaric Acid Resistant Barley Plants. *Plant Breeding* **99**: 159-163
- Chen C** (1977) In vitro development of plants from microspores of rice. *In Vitro* **Aug:13**: 484-489
- Chen J, Griffey CA, Saghai Maroof MA, Stromberg EL, Biyashev RM, Zhao W, Chappell MR, Pridgen TH, Dong Y, Zeng Z** (2006) Validation of two major quantitative trait loci for Fusarium head blight resistance in Chinese wheat line W14. *Plant Breeding* **125**: 99-101
- Chen WP, Chen PD, Liu DJ, Kynast R, Friebe B, Velazhahan R, Muthukrishnan S, Gill BS** (1999) Development of wheat scab symptoms is delayed in transgenic wheat plants that constitutively express a rice thaumatin-like protein gene. *TAG Theoretical and Applied Genetics* **99**: 755-760
- Chen X, Steed A, Travella S, Keller B, Nicholson P** (2009) "Fusarium graminearum" exploits ethylene signalling to colonize dicotyledonous and monocotyledonous plants. *New Phytologist* **182**: 975-983
- Chen XW, Cistue L, Muñoz-Amatriain M, Sanz M, Romagosa I, Castillo AM, Valles MP** (2007) Genetic markers for doubled haploid response in barley. *Euphytica* **158**: 287-294
- Cho UH, Kasha KJ** (1989) Ethylene production and embryogenesis from anther cultures of barley (*Hordeum vulgare*). *Plant cell reports* **8**: 415-417
- Choi E-Y, Kolesik P, McNeill ANN, Collins H, Zhang Q, Huynh B-L, Graham R, Stangoulis J** (2007) The mechanism of boron tolerance for maintenance of root growth in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant, cell & environment* **30**: 984-993
- Choi EY, McNeill A, Coventry D, Stangoulis J** (2006) Whole plant response of crop and weed species to high subsoil boron. *Australian Journal of Agricultural Research* **57**: 761-770
- Chowdhury B, Mandal AB, Bandyopadhyay AK** (1998) Development of aluminium toxicity tolerant rice through in vitro screening at cellular level. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* **6**: 61-67
- Dahleen L, S., Agrama HA, Horsley RD, Steffenson BJ, Schwarz PB, Mesfin A, Franckowiak JD** (2003) Identification of QTLs associated with Fusarium head blight resistance in Zhedar 2 barley. *Theoretical Applied Genetics* **Dec;108**: 95-104
- Dahleen LS, Agrama HA, Horsley RD, Steffenson BJ, Schwarz PB, Mesfin A, JD. F** (2003) Identification of QTLs associated with Fusarium head blight resistance in Zhedar 2 barley. *Theoretical Applied Genetics* **Dec;108**: 95-104
- De La Pena RC, Smith KP, Capettini F, Muehlbauer GJ, Gallo-Meagher M, Dill-Macky R, Somers DA, Rasmusson DC** (1999) Quantitative trait loci associated with resistance to Fusarium head blight and kernel discoloration in barley. *Theoretical and Applied Genetics* **99**: 561-569
- De Nijs M, Soentoro P, Asch ED, Kamphuis H, Rombouts FM, Notermans SHW** (1996) Fungal infection and presence of deoxynivalenol and zearalenone in cereals grown in the Netherlands. *Journal of Food Protection* **59**: 772-777
- Deadman ML, Cooke BM** (1988) The effect of Drechslera teres seed infection on spring barley seedling growth. *Annals of Applied Biology* **112**: 385-388
- Debergh P, Aitken-Christie J, Cohen D, Grout B, Arnold S, Zimmerman R, Ziv M** (1992) Reconsideration of the term "vitrification" as used in micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **30**: 135-140
- Desjardins AE** (2006) Fusarium mycotoxins. *Chemistry, genetics, and biology*,

- Desjardins AE, Hohn TM, McCormick SP** (1993) Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: Chemistry, genetics, and significance. *Microbiological Reviews* **57**: 595-604
- Desjardins AE, Hohn TM, McCormick SP, Proctor RH** (1995) Biochemistry and regulation of trichothecene toxin biosynthesis in *Fusarium*.
- Desmond OJ, Manners JM, Stephens AE, MacLean DJ, Schenk PM, Gardiner DM, Munn AL, Kazan K** (2008) The *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol elicits hydrogen peroxide production, programmed cell death and defence responses in wheat. *Molecular plant pathology* **9**: 435-445
- Devaux P, Kilian A, Kleinhofs A** (1995) Comparative mapping of the barley genome with male and female recombination-derived, doubled haploid populations. *Molecular Genetics and Genomics* **249**: 600 - 608
- Deveaux P, Pickering RA** (2005) Haploids in the improvement of Poaceae. In CE Palmer, WA Keller, KJ Kasha, eds, *Haploids in Crop Improvement II*, Vol 56. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 215-242
- Diamond H, Cooke BM** (1999) Towards the development of a novel in vitro strategy for early screening of *Fusarium* ear blight resistance in adult winter wheat plants. *European Journal of Plant Pathology* **105**: 363-372
- Dix P** (1990) *Plant cell line selection: Procedures and Applications*. VHC, New York
- Dodds J, Roberts LW** (1985) *Experiments in plant tissue culture*, Ed 2nd ed. Cambridge University Press
- Doohan FM, Brennan J, Cooke BM** (2003) Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. *European Journal of Plant Pathology* **109**: 755-768
- Dubcovsky J, Luo MC, Zhong GY, Bransteitter R, Desai A, Kilian A, Kleinhofs A, Dvorak J** (1996) Genetic map of diploid wheat, *Triticum monococcum* L., and its comparison with maps of *Hordeum vulgare* L. *Genetics* **143**: 983
- Duncan RR, Waskom RM, Nabors MW** (1995) In-vitro screening and field-evaluation of tissue-culture-regenerated sorghum (*Sorghum-bicolor* (L) Moench) for soil stress tolerance. *Euphytica* **85**: 373-380
- Eaton SV** (1940) Effects of boron deficiency and excess on plants. *Plant Physiology* **15**: 95-107
- Eglinton JK, Reid RJ, Hayes JE, Davies P, Jha D, McDonald G** (2004) Boron Toxicity in Barley: Prospects for Delivering a Yield Advantage. In 9th International Barley Genetics Symposium Brno, p 5
- Elmholt S, Felding G, Hestbjerg H** (2002) *Fusarium culmorum* infection of barley seedlings: correlation between aggressiveness and deoxynivalenol content. *Phytopathologische Zeitschrift* **150**: 308-312
- Emebiri LC, Michael P, Moody DB** (2009) Enhanced tolerance to boron toxicity in two-rowed barley by marker-assisted introgression of favourable alleles derived from Sahara 3771. *Plant and Soil* **314**: 77-85
- Eudes F, Collin J, Rioux S, Comeau A** (1997) The trichothecenes, a major component of wheat scab pathogenesis. *Cereal Research Communications* **25**: 495-496
- Eudes F, Comeau A, Rioux S, Collin J** (2000) Phytotoxicity of eight mycotoxins associated with fusariosis in wheat. *Phytotoxicite de huit mycotoxines associees a la fusariose de l'epi chez le ble* **22**: 286-292
- Eudes F, Comeau A, Rioux S, Collin J** (2008) Trichothecene-mediated in vitro selection in wheat for reduced mycotoxin accumulation caused by *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Science* **88**: 1115-1125

- Fadel F, Wenzel G** (1993) In vitro Selection for Tolerance to Fusarium in F1 Microspore Populations of Wheat. *Plant Breeding* **110**: 89-95
- FAO** (2004) What is agricultural biotechnology? *In* The State of Food and Agriculture 2003-2004. Agricultural Biotechnology: Meeting the needs of the poor. Editorial Production and Design Group Publishing Management Service FAO, Rome
- FAO** (2008) FAOSTAT database. *In* <http://faostat.fao.org/Portals/Faostat/documents/pdf/world.pdf>, ed,
- Flowers TJ** (2004) Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany* **55**: 307-319
- Forster B** (1997) Locating genotypes and genes for abiotic stress tolerance in barley: a strategy using maps, markers and the wild species. *The New phytologist* **137**: 141-147
- Frankel OH** (1958) Plant Breeding. *Journal of the Australian Institute of Agricultural Science*: 24:112
- Fried PM, E. M** (1987) Inheritance of leaf and head resistance of winter wheat to *Septoria nodorum* in a diallel cross. *Phytopathology* **77**: 1371-1375
- Gale MD, Devos KM** (1998) Comparative genetics in the grasses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 1971-1974
- Gang G, Miedaner T, Schuhmacher U, Schollenberger M, Geiger HH** (1998) Deoxynivalenol and nivalenol production by *Fusarium culmorum* isolates differing in aggressiveness toward winter rye. *Phytopathology* **88**: 879-884
- Gauch HG, Dugger WM** (1954) The physiological action of boron in higher plants: A review and interpretation. University of Maryland Agricultural Experimental Station Technical Bulletin A-80
- Gautheret RJ** (1937) Nouvelles reserches sur la culture de tissu cambial. *In*, Vol 20. *Comptes Rendu Academie of Science*, p 572
- George EF, Hall M.A., G.J. DK** (1995) Plant propagation by tissue culture. . Springer Netherlands
- Gillespie M, Scofield S** (2011) **Ethylene-signaling in wheat is essential for type I and II resistance to *Fusarium graminearum* and tolerance to deoxynivalenol.** *In* National Fusarium Head Blight Forum, Minnesota, p 86
- Goldberg S** (1997) Reactions of boron with soils. *Plant and Soil* **193**: 35-48
- Goswami RSRS** (2004) Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular plant pathology* **5**: 515-525
- Grains P** (2009) Small Grains Research Initiative Update. *In* Special Report. University of Minnesota
- Grando S, Macpherson H** (2002) Food barley: Importance, uses and local knowledge. *In* Proceedings of the International Workshop on Food Barley Improvement, Vol 14-17. ICARDA, Hammamet, Tunisia, p 2156
- Guo TR, Zhang GP, Zhang YH** (2007) Physiological changes in barley plants under combined toxicity of aluminum, copper and cadmium. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **57**: 182-188
- Gupta UC** (1977) Effects of boron and limestone on cereal yields and on B and N concentration of plant tissue. *Plant and Soil* **47**: 283-287
- Gupta UC, Jame YW, Campbell CA, Leyshon AJ, Nicholaichuk W** (1985) Boron toxicity and deficiency: a review. *Canadian Journal of Soil Science* **65**: 381-409
- Haberlach GT, Budde AD, Sequeira L, Helgeson JP** (1978) Modification of disease resistance of tobacco callus tissues by cytokinins. *Plant Physiology* **62**: 522-525
- Hagberg A, Hagberg G** (1980) High frequency of spontaneous haploids in the progeny of an induced mutation in barley. *Hereditas* **93**: 341-343

- Hall MD, Van Sanford DA** (2003) Diallel analysis of fusarium head blight resistance in soft red winter wheat. *Crop Science* **43**: 1663-1670
- Halley S, Arens A** (2010) Crop Rotation, Prosaro Fungicide, Seed Treatment and Cultivar as Management Tools to Control Disease on Six-Row Barley. *In* Barley, Vol Langdon, 2010. North Dakota State University-Langdon Research Extension Center Langdon, North Dakota
- Hanning E** (1904) Zur Physiologie pflanzlicher Embryonen. Ueber die Kultur von Crucifere-Embryonen ausserhalb de Embryosacks. *In*, Vol 62, Bot. Zeit.
- Hanzel J** (1985) Genotype and media effects on callus formation and regeneration in barley. *Crop science* **25**: 27-31
- Harlan JR, Zohary D** (1966) Distribution of wild wheats and barley. *Science* **153**: 1074-1080
- Harms CT** (1992) Engineering Genetic-Disease Resistance into Crops: Biotechnological Approaches to Crop Protection. *Crop Protection* **11**: 291-306
- Hartman CL, McCoy TJ, Knous TR** (1984) Selection of alfalfa (medicago sativa) cell lines and regeneration of plants resistant to the toxin(s) produced by fusarium oxysporum f. sp. medicaginis. *Plant Science Letters* **34**: 183-194
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ** (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**: 463-499
- Hassan M, Oldach K, Baumann UTE, Langridge P, Sutton TIM** (2010) Genes mapping to boron tolerance QTL in barley identified by suppression subtractive hybridization. *Plant, cell & environment* **33**: 188-198
- Hassan NM, Serag MS, El-Feky FM, Nemat Alla MM** (2008) In vitro selection of mung bean and tomato for improving tolerance to NaCl. *Annals of Applied Biology* **152**: 319-330
- Hayes JE, Reid RJ** (2004) Boron tolerance in barley is mediated by efflux of boron from the roots. *Plant Physiology* **136**: 3376-3382
- Hayes PM, Liu BH, Knapp SJ, Chen F, Jones B, Blake T, Franckowiak J, Rasmusson D, Sorrells M, Ullrich SE, Wesenberg D, Kleinhofs A** (1993) Quantitative trait locus effects and environmental interaction in a sample of North American barley germ plasm. *Theoretical and Applied Genetics* **87**: 392-401
- Hearnden P, Eckermann P, McMichael G, Hayden M, Eglinton J, Chalmers K** (2007) A genetic map of 1,000 SSR and DArT markers in a wide barley cross. *TAG Theoretical and Applied Genetics* **115**: 383-391
- Hernandez-Chavarria F** (2002) Fundamentos de epidemiologia: el arte detectivesco de la investigacion epidemiologica. Editorial Universidad Estatal a Distancia
- Hestbjerg HH** (2002) Fusarium culmorum infection of barley seedlings: Correlation between aggressiveness and deoxynivalenol content. *Journal of phytopathology* **150**: 308-312
- HGCA** (2009) The wheat disease management guide. *In* Clive Edwards, Geoff Dodgson, eds, The wheat disease management guide, Vol HGCA Guide 38
- HGCA** (2010) Guidelines to minimise risk of Fusarium mycotoxins in cereals. *In* Clive Edwards, G Dodgson, eds. HGCA Publications, Warwickshire
- Hill NS, Schwarz P, Dahleen LS, Neate SM, Horsley R, Glenn AE, O'Donnell K** (2006) ELISA Analysis for Fusarium in Barley: Development of Methodology and Field Assessment.

- Hoekstra S, van Zijderveld MH, Louwerse JD, Heidekamp F, van der Mark F** (1992) Anther and microspore culture of *Hordeum vulgare* L. cv. Igri. *Plant Science* **86**: 89-96
- Horsley R** (2006) Integrated use of tebuconazole and fusarium head blight-resistant barley genotypes. *Agronomy Journal* **98**: 194-197
- Horsley RD, Schmierer D, Maier C, Kudrna D, Urrea CA, Steffenson BJ, Schwarz PB, Franckowiak JD, Green MJ, Zhang B, Kleinhofs A** (2005) Identification of QTLs associated with Fusarium head blight resistance in barley accession Clho 4196. *Crop Science* **46**: 145 - 156
- Horsley RD, Schmierer D, Maier C, Kudrna D, Urrea CA, Steffenson BJ, Schwarz PB, Franckowiak JD, Green MJ, Zhang B, Kleinhofs A** (2006) Identification of QTLs associated with fusarium head blight resistance in Barley Accession Clho 4196. *Crop Science* **46**: 145-156
- Hospital F** (2002) Marker-assisted back-cross breeding: a case study in genotype-building theory. *Quantitative Genetics, Genomics, and Plant Breeding*: 135 - 141
- Hou L, Ullrich SE, Kleinhofs A** (1994) Inheritance of anther culture traits in barley. *Crop Science* **34**: 1243-1247
- Hoxter H, Sieber G, Miedaner T, Geiger HH** (1992) Test systems for evaluating quantitative resistance against Fusarium foot rot in inbred lines of winter rye. *Plant Breeding* **108**: 274-282
- Hu H, Brown PH** (1994) Localization of Boron in Cell Walls of Squash and Tobacco and Its Association with Pectin: Evidence for a Structural Role of Boron in the Cell Wall. *Plant Physiology* **105**: 681-689
- Hu HN, Brown PH** (1997) Absorption of boron by plant roots. *Plant and Soil* **193**: 49-58
- Hunter CP** (1988) Plant regeneration from microspores of barley, *Hordeum vulgare*. PhD Thesis. University of London
- Ibañez-Vea M, Lizarraga E, Gonzalez-Peñas E, Lopez de Cerain A** (2011) Co-occurrence of type-A and type-B trichothecenes in barley from a northern region of Spain. *Food Control* **25**: 81-88
- Ikeda T, Higashi S, Kawaide T** (1955) Studies on the wet-injury resistance of wheat and barley varieties. (II) Varietal difference of wet-injury resistance of wheat and barley. Bull Division Plant Breed Cultivation, Tokai-Kinki, National Agricultural Experiment Station **2**: 11-16
- Jacquard C, Nolin F, Hécart C, Grauda D, Rashal I, Dhondt-Cordelier S, Sangwan R, Devaux P, Mazeyrat-Gourbeyre F, Clément C** (2009) Microspore embryogenesis and programmed cell death in barley: effects of copper on albinism in recalcitrant cultivars. *Plant cell reports* **(9)**: 1329-1339
- Jafary H, Albertazzi G, Marcel TC, Niks RE** (2008) High Diversity of Genes for Nonhost Resistance of Barley to Heterologous Rust Fungi. *Genetics* **178**: 2327-2339
- Jain SM** (2001) Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica* **118**: 153-166
- Jain SM** (2005) Major mutation-assisted plant breeding programs supported by FAO/IAEA. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **82**: 113-123
- Jain SM, Sopory SK, Veilleux RE** (1996) In Vitro Haploid Production in Higher Plants, Vol 1-5. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands

- Jame YW, Nicholaichuk W, Leyshon AJ, Campbell CA** (1982) Boron concentration in the soil solution under irrigation: a theoretical analysis. *Canadian Journal of Soil Science* **62**: 461-471
- James WD, Graham CC, Glascock MD, Hanna ASG** (1982) Water-leachable boron from coal ashes. *Environmental Science and Technology* **16**: 195-197
- Jamjod S, Paull JG, Brooks BJ, Rathjen AJ** (1997) Genetic variation in the tolerance of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum*) to high concentrations of boron. *Boron in Soils and Plants*: 111-115
- Jansen C, von Wettstein D, SchÄafer W, Kogel K-H, Felk A, Maier FJ** (2005) Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 16892-16897
- Jefferies SP, Barr AR, Gianquitto P, Warner C, Lewis J, Wheeler R** (2001) Agronomic and breeding value of major genes in an introgression program. *In* *Proceedings of the 10th Australian Barley Technical Symposium*, Canberra, ACT, Australia
- Jefferies SP, Barr AR, Karakousis A, Kretschmer JM, Manning S, Chalmers KJ, Nelson JC, Islam A, Langridge P** (1999) Mapping of chromosome regions conferring boron toxicity tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theoretical and Applied Genetics* **98**: 1293-1303
- Jefferies SP, Pallotta MA, Paull JG, Karakousis A, Kretschmer JM, Manning S, Islam AKMR, Langridge P, Chalmers KJ** (2000) Mapping and validation of chromosome regions conferring boron toxicity tolerance in wheat (*Triticum aestivum*). *Theoretical and Applied Genetics* **101**: 767-777
- Jenkin M, Hu H, Brown P, Graham R, Lance R, Sparrow D** (1993) Investigations of Boron Uptake at the Cellular-Level. *Plant and Soil* **156**: 143-146
- Jones PW** (1990) In vitro selection for disease resistance. *In* *Plant Cell Line Selection: Procedures and Applications*. VCH, Weinheim, pp 113-150
- Jost JP** (1965) Contribution a l'etude de la resistance toxicologique des vegetaux a l'acide fusarique. University of Zurich, Zurich
- K.A. Beaubien, T. Szinyei, K.P. Smith, Steffenson BJ** (2009) Mapping QTL for FHB resistance and don accumulation in barley population COMP351 X M98-102. *In* *National Fusarium Head Blight Forum* Minnesota
- Kang Z, Buchenauer H** (1999) Immunocytochemical localization of fusarium toxins in infected wheat spikes by *Fusarium culmorum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **55**: 275-288
- Kang Z, Buchenauer H** (2000) Cytology and ultrastructure of the infection of wheat spikes by *Fusarium culmorum*. *Mycological Research* **104**: 1083-1093
- Kang Z, Buchenauer H** (2000) Ultrastructural and immunocytochemical investigation of pathogen development and host responses in resistant and susceptible wheat spikes infected by *Fusarium culmorum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **57**: 255-268
- Kang Z, Zingen-Sell I, Buchenauer H** (2005) Infection of wheat spikes by "Fusarium avenaceum"; and alterations of cell wall components in the infected tissue. *European Journal of Plant Pathology* **111**: 19-28
- Karakousis A, Barr AR, Kretschmer JM, Manning S, Jefferies SP, Chalmers KJ, Islam AKM, Langridge P** (2003) Mapping and QTL analysis of the barley population Clipper x Sahara. *Australian Journal of Agricultural Research* **54**: 1137 - 1140

- Kasha KJ** (2005) Chromosome Doubling and Recovery of Doubled Haploid Plants. In CE Don Palmer, W Keller, eds, *Haploids in Crop Improvement II*, Vol 56. Springer Berlin Heidelberg, pp 123-152
- Kaur S, Nicolas ME, Ford R, Norton RM, Taylor PWJ** (2006) Selection of *Brassica rapa* genotypes for tolerance to boron toxicity. *Plant and Soil* **285**: 115-123
- Keren R, Bingham FT, Rhoades JD** (1985) Plant uptake of boron as affected by boron distribution between liquid and soil phases in soil. *Soil Science Society of America Journal* **49**: 297-302
- Kimura M, Tokai T, Takahashi-Ando N, Ohsato S, Fujimura M** (2007) Molecular and genetic studies of Fusarium trichothecene biosynthesis: Pathways, genes, and evolution. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **71**: 2105-2123
- Kislev ME, Nadel D, Carmi I** (1992) Epipalaeolithic (19,000 BP) cereal and fruit diet at Ohalo II, Sea of Galilee, Israel. *Review of Palaeobotany and Palynology* **73**: 161-166
- Kobayashi M, Ohno K, Matoh T** (1997) Boron Nutrition of Cultured Tobacco BY-2 Cells. II. Characterization of the Boron-Polysaccharide Complex. *Plant and Cell Physiology* **38**: 676-683
- Koga H** (1995) An Electron Microscopic Study of the Infection of Spikelets of Rice by *Pyricularia oryzae*. *Journal of phytopathology* **143**: 439-445
- Kolb FL, Bai GH, Muehlbauer GJ, Anderson JA, Smith KP, Fedak G** (2001) Host plant resistance genes for fusarium head blight: Mapping and manipulation with molecular markers. *Crop Science* **41**: 611-619
- Kondorosi E, Roudier Fo, Gendreau E** (2000) Plant cell-size control: growing by ploidy? Current opinion in plant biology **3**: 488-492
- Langevin F, Eudes F, Comeau A** (2004) Effect of trichothecenes produced by *Fusarium graminearum* during *Fusarium* head blight development in six cereal species. *European Journal of Plant Pathology* **110**: 735-746
- Large EC** (1954) Growth stages in cereals illustration of the Feekes scale. *Plant Pathology* **3**: 128-129
- Larkin PJ, Scowcroft WR** (1981) Somaclonal variation - A novel source of variability from cell-cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics* **60**: 197-214
- Larsen E** (1991) Nuclear genes affecting percentage of green plants in barley (*Hordeum vulgare* L.) anther culture. *Theoretical and applied genetics* **82**: 417-420
- Lee SY, Lee JH, Kwon TO** (2003) Selection of salt-tolerant doubled haploids in rice anther culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **74**: 143-149
- Lemmens M, Scholz U, Berthiller F, Dall'Asta C, Koutnik A, Schuhmacher R, Adam G, Buerstmayr H, Mesterhazy A, Krska R, Ruckebauer P** (2005) The ability to detoxify the mycotoxin deoxynivalenol colocalizes with a major quantitative trait locus for fusarium head blight resistance in wheat. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**: 1318-1324
- Leonard KJ, Bushnell WR** (2004) *Fusarium Head Blight of Wheat and Barley*. APS Press
- Li H, Devaux P** (2003) High frequency regeneration of barley doubled haploid plants from isolated microspore culture. *Plant Science* **164**: 379-386
- Li HC, Devaux P** (2005) Isolated microspore culture overperforms anther culture for green plant regeneration in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Acta Physiologiae Plantarum* **27**: 611-619

- Li X, Yu X, Wang N, Feng Q, Dong Z, Liu L, Shen J, Liu B** (2007) Genetic and epigenetic instabilities induced by tissue culture in wild barley (*Hordeum brevisubulatum*; (Trin.)). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **90**: 153-168
- Liddell CM** (1991) Introduction: Recent Advances in Fusarium Systematics. *Phytopathology* **81**: 1044:1045
- Liddell CM** (2004) Systematics of Fusarium Species and Allies Associated with Fusarium Head Blight. *In* KJ Leonard, WR Bushnell, eds, *Fusarium Head Blight of Wheat and Barley*. APS Press
- Linde-Laursen I, Heslop-Harrison JS, Shepherd KW, Taketa S** (1997) The barley genome and its relationship with the wheat genomes. A survey with an internationally agreed recommendation for barley chromosome nomenclature. *Hereditas* **126**: 1-16
- Logrieco A, Bottalico A, Mule G, Moretti A, Perrone G** (2003) Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *European Journal of Plant Pathology* **109**: 645-667
- Loomis WD, Durst RW** (1992) Chemistry and biology of boron. *BioFactors* **3**: 229-239
- López-Encina C** (2012) Encuentros en la biología. Vitricación de plantas cultivadas in vitro. *In*, Ed <http://www.encuentros.uma.es/encuentros28/28vitricacion.html>
- Ma H, Ge H, Zhang X, Lu W, Yu D, Chen H, Chen J** (2009) Resistance to Fusarium head Blight and Deoxynivalenol Accumulation in Chinese Barley. *Journal of phytopathology* **157**: 166-171
- Ma Z, Steffenson BJ, Prom LK, Lapitan NLV** (2000) Mapping of quantitative trait loci for Fusarium head blight resistance in barley. *Phytopathology* **90**: 1079-1088
- Mackintosh CA, Lewis J, Radmer LE, Shin S, Heinen SJ, Smith LA, Wyckoff MN, Dill-Macky R, Evans CK, Kravchenko S** (2007) Overexpression of defense response genes in transgenic wheat enhances resistance to Fusarium head blight. *Plant cell reports* **26**: 479-488
- Mahalakshmi V, Yau SK, Ryan J, Peacock JM** (1995) Boron toxicity in barley (*Hordeum vulgare* L) seedlings in relation to soil temperature. *Plant and Soil* **177**: 151-156
- Mano Y, Takeda K** (1997) Mapping quantitative trait loci for salt tolerance at germination and the seedling stage in barley (*Hordeum vulgare* L). *Euphytica* **94**: 263-272
- MAPA** (2010) Anuario de estadística *In* <http://www.mapa.es/es/estadistica/pags/anuario/2008/indice.asp?parte=3&capitulo=20&grupo=1>. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino
- MAPA** (2010) Patógenos de plantas descritos en España, Ed 2ª. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Secretaría General Técnica, Centro de Publicaciones
- Mardi M, Buerstmayr H, Ghareyazie B, Lemmens M, Mohammadi SA, Nolz R, Ruckebauer P** (2005) QTL analysis of resistance to Fusarium head blight in wheat using a 'Wangshuibai'-derived population. *Plant Breeding* **124**: 329-333
- Mardi M, Buerstmayr H, Ghareyazie B, Lemmens M, Moshrefzadeh N, Ruckebauer P** (2004) Combining ability analysis of resistance to head blight caused by Fusarium graminearum in spring wheat. *Euphytica* **139**: 45-50
- Markell SG, Francel LJ** (2003) Fusarium head blight inoculum: species prevalence and *Gibberella zeae* spore type. *Plant Disease* **87**: 814-820

- Marquez-Cedillo LA, Hayes PM, Jones BL, Kleinhofs A, Legge WG, Rossnagel BG, Sato K, Ullrich SE, Wesenberg DM, North American Barley Genome Mapping P** (2000) QTL analysis of malting quality in barley based on the doubled-haploid progeny of two elite North American varieties representing different germplasm groups. *Theoretical and Applied Genetics* **101**: 173-184
- Matoh T** (1997) Boron in plant cell walls. *Plant and Soil* **193**: 59-70
- Matsui K, Yoshida M, Ban T, Komatsuda T, Kawada N** (2002) Role of male-sterile cytoplasm in resistance to barley yellow mosaic virus and Fusarium head blight in barley. *Plant Breeding* **121**: 237-240
- McCormick S, Leonard KJ, Bushnell WR** (2003) The role of DON in pathogenicity. *In* *Fusarium Head Blight of Wheat and Barley*, pp 165-183
- McDonald GK, Eglinton JK, Barr AR** (2009) Assessment of the agronomic value of QTL on chromosomes 2H and 4H linked to tolerance to boron toxicity in barley (*Hordeum vulgare L.*). *Plant and Soil* **326**: 275-290
- McKevith B** (2004) Nutritional aspects of cereals. *Nutrition Bulletin* **29**: 111-142
- Mesfin A, Smith KP, Dill-Macky R, Evans CK, Waugh R, Gustus CD, Muehlbauer GJ** (2003) Quantitative trait loci for Fusarium head blight resistance in barley detected in a two-rowed by six-rowed population. *Crop Science* **43**: 307 - 318
- Mesterhazy A** (1987) Selection of Head Blight Resistant Wheats through Improved Seedling Resistance. *Plant Breeding* **98**: 25-36
- Mesterhazy A** (2002) Role of deoxynivalenol in aggressiveness of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* and in resistance to Fusarium head blight. *European Journal of Plant Pathology* **108**: 675-684
- Mesterhazy A** (2002) Role of deoxynivalenol in aggressiveness of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* and in resistance to Fusarium head blight. *European Journal of Plant Pathology* **108**: 675-684
- Mesterhazy A** (2004) Breeding wheat for fusarium head blight resistance in Europe *In* KJ Leonard, WR Bushnell, eds, *Fusarium Head Blight of Wheat and Barley* APS Press
- Mesterhazy A, Bartok T, Kaszonyi G, Varga M, Toth B, Varga J** (2005) Common resistance to different *Fusarium spp.* causing Fusarium head blight in wheat. *European Journal of Plant Pathology* **112**: 267-281
- Mesterhazy A, Bartok T, Mirocha CG, Komoroczy R** (1999) Nature of wheat resistance to Fusarium head blight and the role of deoxynivalenol for breeding. *Plant Breeding* **118**: 97-110
- Miedaner T, Borchardt DC, Geiger HH** (1993) Genetic-analysis of inbred lines and their crosses for resistance to head blight (*Fusarium culmorum*, *F.graminearum*) in winter rye. *Euphytica* **65**: 123-133
- Miedaner T, Moldovan A, Ittu M** (2003) Comparison of spray and point inoculation to assess resistance to fusarium head blight in a multienvironment wheat trial. *Phytopathology* **93**: 1068-1072
- Miedaner T, Reinbrecht C, Lauber U, Schollenberger M, Geiger HH** (2001) Effects of genotype and genotype-environment interaction on deoxynivalenol accumulation and resistance to Fusarium head blight in rye, triticale, and wheat. *Plant Breeding* **120**: 97-105
- Miedaner T, Schneider B, Geiger HH** (2003) Deoxynivalenol (DON) content and Fusarium head blight resistance in segregating populations of winter rye and winter wheat. *Crop Science* **43**: 519-526
- Miftahudin, Ross K, Ma XF, Mahmoud AA, Layton J, Milla MAR, Chikmawati T, Ramalingam J, Feril O, Pathan MS, Momirovic GS, Kim S, Chema K, Fang**

- P, Haule L, Struxness H, Birkes J, Yaghoubian C, Skinner R, McAllister J, Nguyen V, Qi LL, Echalié B, Gill BS, Linkiewicz AM, Dubcovsky J, Akhunov ED, Dvoak J, Dilbirligi M, Gill KS, Peng JH, Lapitan NLV, Bermudez-Kandianis CE, Sorrells ME, Hossain KG, Kalavacharla V, Kianian SF, Lazo GR, Chao S, Anderson OD, Gonzalez-Hernandez J, Conley EJ, Anderson JA, Choi DW, Fenton RD, Close TJ, McGuire PE, Qualset CO, Nguyen HT, Gustafson JP** (2004) Analysis of Expressed Sequence Tag Loci on Wheat Chromosome Group 4. *Genetics* **168**: 651-663
- Miller JD, Arnison PG** (1986) Degradation of deoxynivalenol by suspension cultures of the *Fusarium* head blight resistant wheat cultivar Frontana. *Canadian Journal of Plant Pathology* **8**: 147-150
- Miller JD, Young JC, Sampson DR** (1985) Deoxynivalenol and *Fusarium* Head Blight Resistance in Spring Cereals. *Phytopathologische Zeitschrift-Journal of Phytopathology* **113**: 359-367
- Mirocha CJ, Kolaczowski E, Xie W, Yu H, Jelen H** (1998) Analysis of deoxynivalenol and its derivatives (batch and single kernel) using gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**: 1414-1418
- Mirocha CJ, Xie, Filho W** (2003) Chemistry and detection of *Fusarium* mycotoxins. In *Fusarium head blight of wheat and barley*. APS Press, St. Paul, pp 144-164
- Miwa K, Takano J, Fujiwara T** (2006) Improvement of seed yields under boron-limiting conditions through overexpression of BOR1, a boron transporter for xylem loading, in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **46**: 1084-1091
- Miwa K, Takano J, Omori H, Seki M, Shinozaki K, Fujiwara T** (2007) Plants tolerant of high boron levels. *Science* **318**: 1417
- Molina-Cano JL, Moralejo M, Igartua E, Romagosa I** (1999) Further evidence supporting Morocco as a centre of origin of barley. *Theoretical and Applied Genetics* **98**: 913-918
- Molina Cano JL** (1989) *La cebada*. Madrid: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación Mundi-Prensa
- Monzón A., L. R-TJ** (1999) Infecciones causadas por el género *Fusarium*. In *Control de Calidad SEIMC*. SEIMC
- Moody, Rathjen AJ, Cartwright B** (1993) Yield evaluation of a gene for boron tolerance. In P Randall, E Delhaize, RA Richards, R Munns, eds, *Genetic aspects of plant mineral nutrition*. Kluwer Academic Publ, Dordrecht, The Netherlands, pp 363-366
- Moreau L, Charcosset A, Hospital F, Gallais A** (1998) Marker-Assisted Selection Efficiency in Populations of Finite Size. *Genetics* **148**: 1353-1365
- Morgavi DP, Riley RT** (2007) An historical overview of field disease outbreaks known or suspected to be caused by consumption of feeds contaminated with *Fusarium* toxins. *Animal Feed Science and Technology* **137**: 201-212
- Muehlbauer GJ, Garvin DF, Smith K, Boddu J, Cho S** (2005) Applications of GeneChips for barley improvement. In 18th North American Barley Researchers Workshop and 4th Canadian Barley Symposium, Red Deer, Alberta
- Muñoz-Amatriain M, Svensson JT, Castillo AM, Close TJ, Valles MP** (2009) Microspore embryogenesis: Assignment of genes to embryo formation and green vs. albino plant production. *Functional and Integrative Genomics* **9**: 311-323
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 473-497

- Muthomi JW, Schutze A, Dehne HW, Mutitu EW, Oerke EC** (2000) Characterization of *Fusarium culmorum* isolates by mycotoxin production and aggressiveness to winter wheat. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **107**: 113-123
- Nable RO** (1988) Resistance to boron toxicity amongst several barley and wheat cultivars: A preliminary examination of the resistance mechanism. *Plant and Soil* **112**: 45-52
- Nable RO, Banuelos GS, Paull JG** (1997) Boron toxicity. *Plant and Soil* **193**: 181-198
- Nable RO, Lance RCM, Cartwright B** (1990) Uptake of boron and silicon by barley genotypes with differing susceptibilities to boron toxicity. *Annals of Botany* **66**: 83-90
- Nable RO, Paull JG, Cartwright B** (1990) Problems associated with the use of foliar analysis for diagnosing boron toxicity in barley. *Plant and Soil* **128**: 225-232
- Nakagawa Y, Hanaoka H, Kobayashi M, Miyoshi K, Miwa K, Fujiwara T** (2007) Cell-type specificity of the expression of OsBOR1, a rice efflux boron transporter gene, is regulated in response to boron availability for efficient boron uptake and xylem loading. *Plant Cell* **19**: 2624-2635
- Naresh Magan AD** (2004) Prevention strategies for trichothecenes. *Toxicology Letters* **153**: 165-171
- Nesvadba Z, Vyhnanek T, Jeziskova I, Tvaruzek L, Spunarova M, Spunar J** (2006) Evaluation of spring barley genotypes with different susceptibility to *Fusarium* head blight using molecular markers. *Plant soil and environment* **52**: 485
- Nicholson P, Simpson DR, Weston G, Rezanoor HN, Lees AK, Parry DW, Joyce D** (1998) Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **53**: 17-37
- Nielsen FH** (1997) Boron in human and animal nutrition. *Plant and Soil* **193**: 199-208
- Nielsen FH** (2008) Is boron nutritionally relevant? *Nutrition Reviews* **66**: 183-191
- Nobécourt P** (1937) Cultures en série de tissus végétaux sur milieu artificiel. *In*, *Comptes Rendu Académie of Science*, p 521
- Nuttall JG, Armstrong RD, Connor DJ** (2005) The effect of boron tolerance, deep ripping with gypsum, and water supply on subsoil water extraction of cereals on an alkaline soil. *Australian Journal of Agricultural Research* **56**: 113-122
- Obert B, Barnabás B** (2004) Colchicine Induced Embryogenesis in Maize. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **77**: 283-285
- Ohsato SS** (2007) Transgenic rice plants expressing trichothecene 3-O-acetyltransferase show resistance to the *Fusarium* phytotoxin deoxynivalenol. *Plant cell reports* **26**: 531-538
- Olsen F** (1987) Induction of microspore embryogenesis in cultured anthers of *hordeum vulgare*. The effects of ammonium nitrate, glutamine and asparagine as nitrogen sources. *Carlsberg Research Communications* **52**: 393-404
- Ou G, Wang WC, Nguyen HT** (1989) Inheritance of somatic embryogenesis and organ regeneration from immature embryo cultures of winter wheat. *TAG Theoretical and Applied Genetics* **78**: 137-142
- Ouyang JW, He DG, Feng GH, Jia SE** (1987) The response of anther culture to culture temperature varies with growth conditions of anther donor plants. *Plant Science* **49**: 145-148
- Palmer CED, Keller WA, Kasha KJ** (2005) Haploids in crop improvement II, Vol 56. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg

- Parry DW, Jenkinson P, McLeod L** (1995) Fusarium Ear Blight (Scab) In Small-Grain Cereals - A Review. *Plant Pathology* **44**: 207-238
- Paull JG** (1990) Genetic Studies on the Tolerance of Wheat to High Concentrations of Boron. University of Adelaide, Glen Osmond, South Australia
- Paull JG, Nable RO, Rathjen AJ** (1992) Physiological and genetic-control of the tolerance of wheat to high-concentrations of boron and implications for plant-breeding. *Plant and Soil* **146**: 251-260
- Paull JG, Rathjen AJ, Cartwright B** (1991) Major gene-control of tolerance of bread wheat (*Triticum-aestivum* L) to high-concentrations of soil boron. *Euphytica* **55**: 217-228
- Paull JG, Rathjen AJ, Langridge P, McIntosh RA** (1993) Location of genes controlling boron tolerance of wheat. *Proceedings of 8th International Wheat Genetic Symposium*: 1065-1069
- Payne RW, Murray DA, Harding SA, Baird DB, Soutar DM** (2003) GenStat for Windows. In, Ed 7th Edition. VSN International, Hemel Hempstead
- Perkowski J, Kaczmarek Z** (2002) Distribution of deoxynivalenol and 3-acetyldeoxynivalenol in naturally contaminated and *Fusarium culmorum* infected triticale samples. *Nahrung - Food* **46**: 415-419
- Pestka JJ, Smolinski AT** (2005) Deoxynivalenol: Toxicology And Potential Effects On Humans. *Journal of Toxicology & Environmental Health: Part B* **8**: 39-69
- Pfeffer H, Dannel F, Romheld V** (1999) Are there two mechanisms for boron uptake in sunflower? *Journal of Plant Physiology* **155**: 34-40
- Pieters MN, Freijer J, Baars BJ, Fiolet DC, van Klaveren J, W. S** (2002) Risk assessment of deoxynivalenol in food: concentration limits, exposure and effects. *Adv Exp Med Biol*: 235-248
- Pillen K, Zacharias A, Leon J** (2003) Advanced backcross QTL analysis in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theoretical Applied Genetics* **107**: 340-352
- Placinta CM, D'Mello JPF, Macdonald AMC** (1999) A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology* **78**: 21-37
- Ploquin J** (1967) Le bore dans l'alimentation. *Bull. Soc. Sci. Hyg. Aliment.* **55**: 70-113
- Pofelis S, Le H, Grant WF** (1992) The development of sulfonylurea herbicide-resistant birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) plants from in vitro selection. *Theoretical and Applied Genetics* **83**: 480-488
- Poppenberger B, Berthiller F, Lucyshyn D, Sieberer T, Schuhmacher R, Krska R, Kuchler K, Glossl J, Luschnig C, Adam G** (2003) Detoxification of the *Fusarium* Mycotoxin Deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 47905-47914
- Power PP, Woods WG** (1997) The chemistry of boron and its speciation in plants. *Plant and Soil* **193**: 1-13
- Pritchard JK, M. Stephens, Donnelly P** (2000) Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics* **155**: 945-959
- Pritsch C, Muehlbauer GJ, Bushnell WR, Somers DA, Vance CP** (2000) Fungal development and induction of defense response genes during early infection of wheat spikes by *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**: 159-169
- Pritsch C, Vance CP, Bushnell WR, Somers DA, Hohn TM, Muehlbauer GJ** (2001) Systemic expression of defense response genes in wheat spikes as a response to *Fusarium graminearum* infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **58**: 1-12

- Proctor RH, Hohn TM, McCormick SP** (1995) Reduced Virulence of *Gibberella zeae* Caused by Disruption of a Trichthecine Toxin Biosynthetic Gene. *Molecular Plant Microbe Interactions* **8**: 1995-1908
- Proctor RH, Hohn TM, McCormick SP** (1997) Restoration of wild-type virulence to Tri5 disruption mutants of *Gibberella zeae* via gene reversion and mutant complementation. *Microbiology* **143**: 2583
- Prom LK, Steffenson BJ, Salas B, Fetch TG, Casper HH** (1997) Barley accessions resistant to Fusarium head blight and the accumulation of deoxynivalenol. *Cereal Research Communications* **25**: 807-808
- Rai M, Kalia R, Singh R, Gangola M, Dhawan AK** (2011) Developing stress tolerant plants through in vitro selection: An overview of the recent progress. *Environmental and Experimental Botany* **71**: 89-98
- Rai MK, Kalia RK, Singh R, Gangola MP, Dhawan AK** (2001) Developing stress tolerant plants through in vitro selection. An overview of the recent progress. *Environmental and Experimental Botany* **71**: 89-98
- Rai MK, Kalia RK, Singh R, Gangola MP, Dhawan AK** (2011) Developing stress tolerant plants through in vitro selection - An overview of the recent progress. *Environmental and Experimental Botany* **71**: 89-98
- Raina SK** (1997) Doubled haploid breeding in cereals. *Plant Breeding Reviews* **15**: 141-186
- Ramanna MS, Hermsen JGT** (1974) Embryoid formation in the anthers of some interspecific hybrids in *Solanum*. *Euphytica* **23**: 423-427
- Ramsay L, Macaulay M, Ivanissevich SD, MacLean K, Cardle L, Fuller J, Edwards KJ, Tuveson S, Morgante M, Massari A, Maestri E, Marmiroli N, Sjakste T, Ganai M, Powell W, Waugh R** (2000) A Simple Sequence Repeat-based linkage map of barley. *Genetics* **156**: 1997 - 2005
- Rashid A, Siddiqui AW, Reinert J** (1982) Subcellular aspects of origin and structure of pollen embryos of *Nicotiana*. *Protoplasma* **113**: 202-208
- Raven JA** (1980) Short- and long-distance transport of boric acid in plants. *New Phytologist* **84**: 231-249
- Razdan MK** (2003) Germplasm Conservation *In* MK Razdan, ed, Introduction to plant tissue culture. Science Publishers, Inc., Enfield (NH), USA
- Redondo J, Busch M, De Witte J-P** (2003) Boron removal from seawater using FILMTECTM high rejection SWRO membranes. *Desalination* **156**: 229-238
- Reid R** (2007) Identification of boron transporter genes likely to be responsible for tolerance to boron toxicity in wheat and barley. *Plant and Cell Physiology* **48**: 1673-1678
- Reid R** (2010) Can we really increase yields by making crop plants tolerant to boron toxicity? *Plant Science* **178**: 9-11
- Reid R, Fitzpatrick K** (2009) Influence of leaf tolerance mechanisms and rain on boron toxicity in barley and wheat. *Plant Physiology* **151**: 413-420
- Reid RJ, Hayes JE, Post A, Stangoulis JCR, Graham RD** (2004) A critical analysis of the causes of boron toxicity in plants. *Plant Cell and Environment* **27**: 1405-1414
- Remotti PC** (1998) *In vitro* selection for crop improvement. *In* Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement. Kluwer Academics Publishers, pp 169-201
- Requena F, Saume E, León A** (2005) Micotoxinas: Riesgos y prevención. *Zootecnia Tropical* **23**: 393-410
- Reynolds T** (1997) Pollen embryogenesis. *Plant Molecular Biology* **33**: 1-10

- Ribichich KF, Lopez SE, Vegetti AC** (2000) Histopathological Spikelet Changes Produced by *Fusarium graminearum* in Susceptible and Resistant Wheat Cultivars. *Plant Disease* **84**: 794-802
- Rikiiski K, Yasuda S** (1994) Comparison of regenerating ability of calli derived from mature and immature embryos in barley varieties. *Bulletin Research Institution Bioresources Okayama University* **2**: 33-42
- Riley MM** (1987) Boron toxicity in barley. *Journal of Plant Nutrition* **10**: 2109-2115
- Riley MM, Robson AD** (1994) Pattern of supply affects boron toxicity in barley. *Journal of Plant Nutrition* **17**: 1721-1738
- Rippert P, Scimemi C, Dubald M, Matringe M** (2004) Engineering Plant Shikimate Pathway for Production of Tocotrienol and Improving Herbicide Resistance. *Plant Physiology* **134**: 92-100
- Riungu GM, Muthomi JW, Narla RD, Wagacha JM, Gathumbi JK** (2008) Management of *Fusarium* head blight of wheat and deoxynivalenol accumulation using antagonistic microorganisms. *Plant Pathology Journal* **7**: 13-19
- Roessner U, Patterson JH, Forbes MG, Fincher GB, Langridge P, Bacic A** (2006) An investigation of boron toxicity in barley using metabolomics. *Plant Physiology* **142**: 1087-1101
- Rotter BA, Prelusky DB, Pestka JJ** (1996) Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A* **48**: 1-34
- Rozema J, Debruin J, Broekman RA** (1992) Effect of Boron on the Growth and Mineral Economy of Some Halophytes and Non-Halophytes. *New Phytologist* **121**: 249-256
- Ruckenbauer P, Buerstmayr H, Lemmens M** (2001) Present strategies in resistance breeding against scab (*Fusarium* spp.). *Euphytica* **119**: 121-127
- Sági L, Barnabás B** (1989) Evidence for cytoplasmic control of in vitro microspore embryogenesis in the anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.). *TAG Theoretical and Applied Genetics* **78**: 867-872
- Sartaj M, Fernandes L** (2005) Adsorption of boron from landfill leachate by peat and the effect of environmental factors. *Journal of Environmental Engineering and Science* **4**: 19-28
- Scudamore KA, Livesey CT** (1998) Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **77**: 1-17
- Schilling AG, Moller EM, Geiger HH** (1996) Polymerase chain reaction-based assays for species-specific detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, and *F. avenaceum*. *Phytopathology* **86**: 515-522
- Schneider DM, Heun M, Fischbeck G** (1991) Inheritance of the Powdery Mildew Resistance Gene Pm9 in Relation to Pm1 and Pm2 of Wheat. *Plant Breeding* **107**: 161-164
- Schnurbusch T, Collins N, Eastwood R, Sutton T, Jefferies S, Langridge P** (2007) Fine mapping and targeted SNP survey using rice-wheat gene colinearity in the region of the *Bo1* boron toxicity tolerance locus of bread wheat. *TAG Theoretical and Applied Genetics* **115**: 451-461
- Schnurbusch T, Langridge P, Sutton T** (2008) The *Bo1*-specific PCR marker AWW5L7 is predictive of boron tolerance status in a range of exotic durum and bread wheats. *Genome* **51**: 963-971
- Schollenberger M, Drochner W, Muller HM** (2007) *Fusarium* toxins of the scirpentriol subgroup: A review. *Mycopathologia* **164**: 101-118

- Schrodter R** (2004) Influence of harvest and storage conditions on trichothecenes levels in various cereals. *Toxicology Letters* **153**: 47-49
- Schroeder HW** (1955) Factors affecting resistance of wheat to scab caused by *Gibberella zeae* (Schw.) Petch. Univ. of Minnesota.
- Schwarz PB, Jones BL, Steffenson BJ** (2002) Enzymes Associated with *Fusarium* Infection of Barley. *Journal American Society of Brewing Chemists* **60**: 130-134
- Seeland T, Bushnell WR** (2001) Effects of deoxynivalenol on barley leaf pigmentation. *In* National *Fusarium* Head Blight Forum Proceedings. Citeseer, Erlanger, KY, p 151
- Seifert KA, Cereal E** (1996) Fuskey: *Fusarium* interactive key. Agriculture & Agri-Food Canada, Research Branch, Eastern Cereal & Oilseed Research Centre
- Shimada T, Otani M** (1990) Effects of *Fusarium* mycotoxins on the growth of shoots and roots at germination in some Japanese wheat cultivars. *Cereal Research Communications* **18**: 229-232
- Shkolnik MY** (1984) Trace elements of plants. *In* MY Shkolnik, ed, *Developsmetns in crop science*, Vol 6. Elsevier Science Publisers, Amsterdam, pp 68-110
- Shu ZH, Wu WYJ, Oberly GH** (1991) Boron uptake by peach leaves slices. *Journal of Plant Nutrition* **14**: 867-881
- Smith KP, Evans CK, Dill-Macky R, Gustus C, Xie W, Dong Y** (2004) Host genetic effect on deoxynivalenol accumulation in *Fusarium* head blight of barley. *Phytopathology* **94**: 766-771
- Smith KP, Schiefelbein EL** (2006) Varietal Trials Results. Barley. Minnesota Agricultural Experiment Station **January 2006**
- Smith RH, Bhaskaran S, Miller FR** (1985) Screening for drought tolerance in Sorghum using cell culture. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* **21**: 541-545
- Snijders CHA** (1990) The Inheritance of Resistance to Head Blight Caused by *Fusarium culmorum* in Winter-Wheat. *Euphytica* **50**: 11-18
- Snijders CHA** (2004) Resistance in wheat to *Fusarium* infection and trichothecene formation. *Toxicology Letters* **153**: 37-46
- Snijders CHA, Krechting CF** (1992) Inhibition of Deoxynivalenol Translocation and Fungal Colonization in *Fusarium* Head Blight Resistant Wheat. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* **70**: 1570-1576
- Snijders CHA, Perkowski J** (1990) Effects of Head Blight Caused by *Fusarium culmorum* on Toxin Content and Weight of Wheat Kernels. *Phytopathology* **80**: 566-570
- Somers DJ, Fedak G, Savard M** (2003) Molecular mapping of novel genes controlling *Fusarium* head blight resistance and deoxynivalenol accumulation in spring wheat. *Genome* **46**: 555-564
- Sommer AL, Lipman CB** (1926) Evidence on the indispensable nature of zinc and boron for higher green plants. *Plant Physiology* **1**: 231-249
- Soriano Castan M** (2008) Embriogénesis de la microspora en trigo panadero: optimización de la producción de plantas doblehaploides y estudio de la expresión de genes de estrés durante el pretratamiento Estación Experimental de Aula Dei Zaragoza
- Sorvari S, Schieder O** (1987) Influence of Sucrose and Melibiose on Barley Anther Cultures in Starch Media. *Plant Breeding* **99**: 164-171
- Soule JD, Kudrna DA, Kleinhofs A** (2000) Isolation, mapping, and characterization of two barley multiovary mutants. *Journal of Heredity* **91**: 483-487

- Steffenson BJ** (2003) Fusarium head blight of barley: Impact, epidemics, management, and strategies for identifying and utilizing genetic resistance. *Fusarium Head Blight of Wheat and Barley*: 241-295
- Steffenson BJ, Hayes PM, Kleinhofs A** (1996) Genetics of seedling and adult plant resistance to net blotch (*Pyrenophora teres f. teres*) and spot blotch (*Cochliobolus sativus*) in barley. *Theoretical and Applied Genetics* **92**: 552-558
- Steiner B, Lemmens M, Griesser M, Scholz U, Schondelmaier J, Buerstmayr H** (2004) Molecular mapping of resistance to Fusarium head blight in the spring wheat cultivar Frontana. *Theoretical and Applied Genetics* **109**: 215-224
- Stevens PF** (2001) Angiosperm Phylogeny Website. Version 9, June 2008. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. In,
- Strobel GA** (1974) Phytotoxins produced by plant parasites. *Annual Review of Plant Physiology* **25**: 541-566
- Sumaryati S, Negrutiu I, Jacobs M** (1992) Characterization and regeneration of salt-stress and water-stress mutants from protoplast culture of *Nicotiana-plumbaginifolia* (Viviani). *Theoretical and Applied Genetics* **83**: 613-619
- Surma M, Adamski T, Chekowski J, Golinski P, Kaczmarek Z, Kostecki M, Perkowski J, Wisniewska H** (2000) Genetic determination of variability of barley doubled haploids inoculated with *Fusarium culmorum* (W.G.Sm.) Sacc. with regard to mycotoxin accumulation and reduction in yield traits. *Journal of Applied Genetics* **41**: 237-246
- Sutton JC** (1982) Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* **4**: 195-209
- Sutton T, Baumann U, Hayes J, Collins NC, Shi BJ, Schnurbusch T, Hay A, Mayo G, Pallotta M, Tester M, Langridge P** (2007) Boron-toxicity tolerance in barley arising from efflux transporter amplification. *Science* **318**: 1446-1449
- Svabova L, Lebeda A** (2005) In vitro selection for improved plant resistance to toxin-producing pathogens. *Journal of Phytopathology* **153**: 52-64
- Swanson EB, Herrgesell MJ, Arnoldo M, Sippell DW, Wong RSC** (1989) Microspore mutagenesis and selection: Canola plants with field tolerance to the imidazolinones. *Theoretical and Applied Genetics* **78**: 525-530
- Szuics P, Blake VC, Bhat PR, Chao S, Close TJ, Cuesta-Marcos A, Muehlbauer GJ, Ramsay L, Waugh R, Hayes PM** (2009) An Integrated Resource for Barley Linkage Map and Malting Quality QTL Alignment. *The Plant Genome* **2**: 134-140
- Takano J, Noguchi K, Yasumori M, Kobayashi M, Gajdos Z, Miwa K, Hayashi H, Yoneyama T, Fujiwara T** (2002) Arabidopsis boron transporter for xylem loading. *Nature* **420**: 337-340
- Tal M** (1994) In vitro selection for salt tolerance in crop plants: Theoretical and practical considerations. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **30**: 175-180
- Tanaka M, Fujiwara T** (2008) Physiological roles and transport mechanisms of boron: perspectives from plants. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* **456**: 671-677
- Thabuis A, Palloix A, Servin B, Daubèze AM, Signoret P, Hospital F, Lefebvre V** (2004) Marker-assisted introgression of 4 *Phytophthora capsici* resistance QTL alleles into a bell pepper line: validation of additive and epistatic effects. *Molecular Breeding* **14**: 9-20
- Thorpe TA** (1995) *In Vitro Embryogenesis in Plants*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers

- Tkachuk R, Dexter JE, Tipples KH** (1991) Removal of sprouted kernels from hard red spring wheat with a specific gravity table. *Cereal Chemistry Journal* **68**: 390-395
- Torun A, Yazici A, Erdem H, Akmak Ü** (2006) Genotypic Variation in Tolerance to Boron Toxicity in 70 Durum Wheat Genotypes. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* **30** 49-58
- Torun B, Kalayci M, Ozturk L, Torun A, Aydin M, Cakmak I** (2003) Differences in shoot boron concentrations, leaf symptoms, and yield of Turkish barley cultivars grown on boron-toxic soil in field. *Journal of Plant Nutrition* **26**: 1735-1747
- Touraev A, Pfosser M, Heberle-Bors E** (2001) The microspore: a haploid multipurpose cell. *Advances in Botanical Research* **35**: 53-109
- Turek M, Dydo P, Trojanowska J, Campen A** (2007) Adsorption/co-precipitation-reverse osmosis system for boron removal. *Desalination* **205**: 192-199
- Tuvesson IKD, Pedersen S, Andersen SB** (1989) Nuclear genes affecting albinism in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. *Theoretical and Applied Genetics* **78**: 879-883
- Urrea CA, Horsley RD, Steffenson BJ, Schwarz PB** (2002) Heritability of Fusarium head blight resistance and deoxynivalenol accumulation from barley accession CIho 4196. *Crop Science* **42**: 1404-1408
- Urrea CA, Horsley RD, Steffenson BJ, Schwarz PB** (2005) Agronomic characteristics, malt quality, and disease resistance of barley germplasm lines with partial fusarium head blight resistance. *Crop Science* **45**: 1235-1240
- USDA** (2006) The Triticeae Toolbox. In <http://malt.pw.usda.gov/t3/sandbox/barley/>, ed. USDA National Institute of Food and Agriculture
- van den Bulk RW** (1991) Application of cell and tissue culture and in vitro selection for disease resistance breeding - a review. *Euphytica* **56**: 269-285
- Van Ooijen JW** (2006) JoinMap 4. Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. Kyazma BV, Wageningen, Netherlands
- Vaneeuwijk EA, Mesterhazy A, Kling CI, Ruckebauer P, Saur L, Burstmayr H, Lemmens M, Keizer LCP, Maurin N, Snijders CHA** (1995) Assessing Nonspecificity Of Resistance In Wheat To Head Blight Caused By Inoculation With European Strains Of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* And *F. nivale* Using A Multiplicative Model For Interaction. *Theoretical and Applied Genetics* **90**: 221-228
- Verma D, Goldberg R, Mascarenhas J** (1988) Anther- and Pollen-Expressed Genes. In *Temporal and Spatial Regulation of Plant Genes*. Springer Vienna, pp 97-115
- Vidhyasekaran P, Ling DH, Borromeo ES, Zapata FJ, Mew TW** (1990) Selection of brown spot-resistant rice plants from *Helminthosporium oryzae* toxin-resistant calluses. *Annals of Applied Biology* **117**: 515-523
- von Bothmer R, Jacobsen N, Baden C, Jørgensen RB, Linde-Laursen I** (1995) An ecogeographical study of the genus *Hordeum*. , Ed 2nd edition. International Plant Genetic Resources Institute, Rome
- von Wettstein-Knowles P** (1993) Barley (*Hordeum vulgare*) 2N = 14. . In OB SJ, ed, *Genetic maps : locus maps of complex genomes*. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Voorrips RE** (2002) MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *The Journal of Heredity* **93**: 77-78.
- Wakulinski W** (1989) Phytotoxicity of the secondary metabolites of fungi causing wheat head fusariosis (head blight). *Acta Physiologiae Plantarum* **11**: 301:306

- Wang S, Basten CJ, Zeng Z-B** (2012) Windows QTL Cartographer 2.5. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC. (<http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>).
- Wang S., C. J. Basten, Zeng Z-B** (2012) Windows QTL Cartographer 2.5. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC. (<http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>).
- Wang YZ, Miller JD** (1988) Effects Of *Fusarium graminearum* Metabolites On Wheat Tissue In Relation To Fusarium Head Blight Resistance. Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift **122**: 118-125
- Warington K** (1923) The effect of boric acid and borax on the broad bean and certain other plants. Annals of Botany **37**: 629-672
- Wenzel G, Foroughi-Wehr B** (1990) Progeny tests of barley, wheat, and potato regenerated from cell cultures after in vitro selection for disease resistance. Theoretical and Applied Genetics **80**: 359-365
- Wenzl P, Li H, Carling J, Zhou M, Raman H, Paul E, Hearnden P, Maier C, Xia L, Caig V, Ovesna J, Cakir M, Poulsen D, Wang J, Raman R, Smith K, Muehlbauer G, Chalmers K, Kleinhofs A, Huttner E, Kilian A** (2006) A high-density consensus map of barley linking DArT markers to SSR, RFLP and STS loci and agricultural traits. BMC Genomics **7**: 206
- White PR** (1954) The Cultivation of Animal and Plant Cells. Roland Press, New York
- Wilde F, Miedaner T** (2006) Selection for Fusarium head blight resistance in early generations reduces the deoxynivalenol (DON) content in grain of winter and spring wheat. Plant Breeding **125**: 96-98
- Williams KJ, Platz GJ, Barr AR, Cheong J, Willsmore K, Cakir M, Wallwork H** (2003) A comparison of the genetics of seedling and adult plant resistance to the spot form of net blotch (*Pyrenophora teres* f. *maculata*). Australian Journal of Agricultural Research **54**: 1387-1394
- Wollenweber HW, Reinking OA** (1935) Die fusarien: ihre beschreibung, schadwirkung und bekämpfung. P. Parey, Berlin
- Wu F** (2007) Measuring the economic impacts of Fusarium toxins in animal feeds. Animal Feed Science and Technology **137**: 363-374
- Xu X** (2003) Effects of environmental conditions on the development of Fusarium ear blight. European Journal of Plant Pathology **109**: 683-689
- Yadong Huang, Benjamin P. Millett , Karen A. Beaubian , Stephanie K. dah , Brian J. Steffenson , Kevin p. Smith , Muehlbauer GJ** (2011) Sequence diversity and haplotype analysis of Fusarium head blight-responsive genes in Diverse Wild and cultivated barley In National Fusarium Head Blight Forum Minnesota
- Yang Z, Yang X, Huang D** (1998) Studies on somaclonal variants for resistance to scab in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) through in vitro selection for tolerance to deoxynivalenol. Euphytica **101**: 213-219
- Yang ZP, Yang XY, Huang DC** (1998) Studies on somaclonal variants for resistance to scab in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) through in vitro selection for tolerance to deoxynivalenol. Euphytica **101**: 213-219
- Yau SK** (2002) Comparison of European with West Asian and North African winter barleys in tolerance to boron toxicity - Tolerance of winter barleys to boron toxicity. Euphytica **123**: 307-314
- Yau SK** (2002) Interactions of boron-toxicity, drought, and genotypes on barley root growth, yield, and other agronomic characters. Australian Journal of Agricultural Research **53**: 347-354

- Yau SK, Nachit MM, Ryan J, Hamblin J** (1995) Phenotypic variation in boron-toxicity tolerance at seedling stage in durum-wheat (*Triticum durum*). *Euphytica* **83**: 185-191
- Yau SK, Ryan J** (2008) Boron toxicity tolerance in crops: A viable alternative to soil amelioration. *Crop Science* **48**: 854-865
- Ye JM, Kao KN, Harvey BL, Rossnagel BG** (1987) Screening salt-tolerant barley genotypes via F1 anther culture in salt stress media. *Theoretical and Applied Genetics* **74**: 426-429
- Yoder OC** (1980) Toxins in pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology* **18**: 103-129
- Yongqing J, W. Y, Dawei X, Jing W, Meixian Y, Guifu L, Guojun D, Dali Z, Zefu L, Xudong Z, Qian Q, Jiayang L** (2010) Regulation of OsSPL14 by OsmiR156 defines ideal plant architecture in rice. *Nature Genetics* **42**: 541-544
- Yoshida M, Kawada N, Tohnooka T** (2005) Effect of row type, flowering type and several other spike characters on resistance to Fusarium head blight in barley. *Euphytica* **141**: 217-227
- Yu GT, Franckowiak JD, Neate SM, Zhang B, Horsley RD** (2010) A native QTL for Fusarium head blight resistance in North American barley (*Hordeum vulgare* L.) independent of height, maturity, and spike type loci. *Genome* **53**: 111-118
- Zair I, Chlyah A, Sabounji K, Tittahsen M, Chlyah H** (2003) Salt tolerance improvement in some wheat cultivars after application of in vitro selection pressure. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **73**: 237-244
- Zhou H, Ball ST, Konzak CF** (1992) Functional properties of ficoll and their influence on anther culture responses of wheat. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **30**: 77-83
- Zhou H, Zheng Y, Konzak CF** (1991) Osmotic potential of media affecting green plant percentage in wheat anther culture. *Plant Cell Reports* **10**: 63-66
- Zhou WC, Kolb FL, Bai GH, Domier LL, Yao JB** (2002) Effect of individual Sumai 3 chromosomes on resistance to scab spread within spikes and deoxynivalenol accumulation within kernels in wheat. *Hereditas* **137**: 81-89
- Zhu E, Wang E** (2007) Boron Environmental Geochemistry and Its Environmental Response. *In* *Advances in Plant and Animal Boron Nutrition*, pp 383-391
- Zhu GY, Kinet JM, Bertin P, Bouharmont J, Lutts S** (2000) Crosses between cultivars and tissue culture-selected plants for salt resistance improvement in rice, *Oryza sativa*. *Plant Breeding* **119**: 497-504
- Zhu H, Gilchrist L, Hayes P, Kleinhofs A, Kudrna D, Liu Z, Prom L, Steffenson B, Toojinda T, Vivar H** (1999) Does function follow form? Principal QTLs for Fusarium head blight (FHB) resistance are coincident with QTLs for inflorescence traits and plant height in a doubled-haploid population of barley. *TAG Theoretical and Applied Genetics* **99**: 1221-1232
- Ziauddin A, Kasha KJ** (1990) Long-Term Callus-Cultures of Diploid Barley (*Hordeum vulgare*).1. Auxin Effects on Culture Initiation and Maintenance. *Euphytica* **48**: 171-176
- Ziv M** (1991) Quality of Micropropagated Plants: Vitrification. *In* *Vitro Cellular & Developmental Biology* **27**: 64-69
- Zohary D** (1969) Origins of domestication. *In* PT Ucko, GW Dumbleby, eds, *The Domestication and Exploitation of Plants and Animal*. Aldine Publishers Co., pp 47-66

Zohary D, Hopf M (2000) Domestication of plants in the old world: The origin and spread of cultivated plants in West Asia, Europe, and the Nile Valley, Ed 3th ed. Clarendon Oxford Press

